

Universidade de São Paulo  
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo



**Fabiana Santos Silva**

Detecção de *Plasmodium* spp. por meio do DNA ambiental (eDNA) associado à interação ecológica entre macaco bugio (*Alouatta guariba clamitans*) e besouros coprófagos (Coleoptera, Scarabaeidae) em áreas de transmissão de malária sítima na Mata Atlântica

**Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional**

**Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior**

**São Paulo  
2020**

**Fabiana Santos Silva**

Detecção de *Plasmodium* spp. por meio do DNA ambiental (eDNA) associado à interação ecológica entre macaco bugio (*Alouatta guariba clamitans*) e besouros coprófagos (Coleoptera, Scarabaeidae) em áreas de transmissão de malária sítima na Mata Atlântica

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Medicina Tropical de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Doenças  
Tropicais e Saúde Internacional**

**Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de  
Andrade Júnior**

**São Paulo  
2020**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Reitor: Prof. Dr. Vahan Agopyan

Vice-Reitor: Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandes



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**

Diretora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

Vice-Diretor: Prof. Dr. Paulo César Cotrim

**BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**

Bibliotecário Chefe: Carlos José Quinteiro

**Endereço:** Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 - 05403-000 - São Paulo – SP - Brasil. *E-mail:* [bibimt@usp.br](mailto:bibimt@usp.br) - Fone: (11) 3061-7003

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Silva, Fabiana Santos

Detecção de *Plasmodium* spp. por meio do DNA ambiental (eDNA) associado à interação ecológica entre macaco bugio (*Alouatta guariba clamitans*) e besouros coprófagos (Coleoptera, Scarabaeidae) em áreas de transmissão de malária símia na Mata Atlântica / Fabiana Santos Silva. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional Orientador:

Heitor Franco de Andrade Júnior

Descritores: 1. *PLASMODIUM*. 2. *ALOUATTA* – MATA ATLÂNTICA. 3. *SCARABAEIDAE*. 4. BIOINDICADORES.

**USP/IMTSP/BIB-13/2019.**

Dedico o presente trabalho a todos os *Alouatta guariba clamitans*, que foram dizimados pela epizootia de febre amarela, principalmente àqueles que viveram no Parque Estadual da Cantareira- PEC e Parque Estadual Alberto Löfgren- PEAL, entre os anos de 2017 – 2018 e também aos besouros coprófagos que foram sacrificados para a realização dessa pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela permissão de realizar essa pesquisa e pela oportunidade do aprendizado e aperfeiçoamento. À Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, que abriu as portas do Instituto de Medicina Tropical da USP, logo após o término do aprimoramento profissional do qual participei na SUCEN/SP. Agradeço por todos esses anos de acolhimento em seu grupo de estudo durante os dois anos de treinamento técnico com Biologia Molecular e pela oportunidade de ter continuado e desenvolvido o meu mestrado. Gratidão pela confiança, respeito, generosidade, paciência e amizade.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr, por me aceitar como aluna, sempre muito prestativo e generoso quando era solicitada a sua atenção.

À Dra. Lícia Natal Fernandes, que me ensinou anos antes de iniciar o mestrado, durante o treinamento técnico, as práticas da Biologia Molecular. Agradeço pela paciência e ao incentivo para continuar meus estudos na área. E também pela ajuda com a compra de reagentes e outros materiais para realizar os experimentos.

À Dra. Izilda Curado, que participou de várias coletas no campo, indicou a quem pedir ajuda para identificar os besouros em São Paulo, sempre muito prestativa e trazendo sempre uma palavra de otimismo.

Ao pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo, Márcio Port Carvalho, que indicou os besouros como uma possibilidade de estudo e também pela ajuda nas primeiras coletas das fezes dos bugios no PEC e PEAL.

Aos funcionários do Instituto Florestal, Vladimir Arraes e Marina Sherer que abriram as portas do PEC e PEAL.

Pelas valiosas contribuições do Dr. Juares Fuhrmann que junto com a professora Dra. Sônia Aparecida Casari, abriram as portas do Museu de Zoologia/USP, para que os besouros Scarabaeinae pudessem ser identificados.

À Dra. Malva Isabel Medina Hernández pela generosidade por disponibilizar referências bibliográficas sobre os besouros Scarabaeinae e por ter participado da qualificação do mestrado.

Ao Dr. Renato Pereira de Souza pela participação na qualificação e pela valiosa contribuição.

Ao Dr. Fernando Zagury Vaz-de-Mello por confirmar a identificação taxonômica dos besouros coletados no PEC, PEAL e IBot e pela ajuda com a bibliografia.

Ao pesquisador do Parque Estadual Fontes do Ipiranga, Eduardo Pereira Cabral Gomes, por abrir as portas do IBot.

Ao pesquisador Cauê Monticelli pela generosidade de disponibilizar referências bibliográficas, sobre os bugios do IBot, enriquecendo ainda mais esse trabalho.

Aos funcionários da SUCEN, João Carlos do Nascimento e Paulo Frugoli dos Santos, que ajudaram nas primeiras coletas de campo, sempre muito atenciosos. Aos motoristas: Gabriel, Luis e Vanderley que nos auxiliaram nas idas ao PEC e PEAL.

A Dra. Regiane Maria Tironi de Menezes, ao Dr. Luis Felipe Mucci e à Técnica de Apoio à Pesquisa Iole Arumi Sei, SUCEN/SP, agradeço muito pelo profissionalismo e além disso, pela confiança e incentivo.

Aos funcionários do IMT/USP, Luciano Monteiro da Silva, pelo suporte com os assuntos burocráticos da pesquisa e da organização do laboratório, à Eliane Araújo, pela ajuda com questões da pós-graduação do IMT, à Isabel Cristina Alves, ao Almir Ferreira e Carlos Quinteiro pelo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao pesquisador do IMT/USP Antônio Charlys da Costa, pelo auxílio com um protocolo específico de PCR convencional que contribuiu muitíssimo para o sequenciamento de algumas amostras.

Aos amigos que conheci no IMT/USP, Igor Lucoves Sicchi, Amanda Lumy Kawanami, Thaís de Moura Coletti, Laura Nobo Costa, Thaysa Carolina Cantanhêde Figueiredo, Cayuan Tadeu Brandão Pinto e Rafael de Oliveira Christe com os quais tive o privilégio de trabalhar e que contribuíram para a construção dessa pesquisa.

Ao grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES, que colaboraram com o desenvolvimento desse projeto por meio da compra de reagentes para as reações de PCR e sequenciamento de DNA.

Ao pesquisador Gabriel Zorello Laporta, que também muito colaborou na parte laboratorial desse trabalho.

À pesquisadora Ana Carolina Loss que colaborou com as análises filogenéticas de algumas sequências de DNA.

Ao pesquisador Antônio Ralph Medeiros de Sousa que ajudou muito com as análises estatísticas e interpretação das mesmas.

Ao amigo Adriano Duarte que ajudou nas coletas no IBot.

Aos dias de coletas em campo, no PEC, PEAL e IBot, onde foi possível contemplar belas paisagens e observar a presença dos bugios e besouros, foram dias muito especiais!

Ao professor Leônidas Deane (*in memoriam*), pelo legado sobre os estudos da malária símia na Serra da Cantareira, que nos inspirou para a realização dessa pesquisa.

Aos meus pais, Ivanildo e Nadiege que respeitaram minha decisão de continuar meus estudos, me apoiando sempre que precisei. Aos meus irmãos Fátima e Luiz Fernando, às minhas sobrinhas Heloísa e Maria Helena, ao meu noivo Ângelo e à Linda (*in memoriam*), que sempre me deram forças para seguir em frente, iluminando minha vida com alegria e amor. Minha gratidão!

“Viva um grande ideal. Todavia, esteja atento às pequeninas coisas”. (Meishu-Sama).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Os resultados preliminares dessa pesquisa foram apresentados no XXVII Congresso Brasileiro de Entomologia e X Congresso Latino-Americano de Entomologia em Gramado/RS em setembro de 2018 com apoio da verba PROAP.

## RESUMO

Silva F S. Detecção de *Plasmodium* spp. por meio do DNA ambiental (eDNA) associado à interação ecológica entre macaco bugio (*Alouatta guariba clamitans*) e besouros coprófagos (Coleoptera, Scarabaeidae) em áreas de transmissão de malária na Mata Atlântica (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019.

Símios são primatas protegidos e de difícil acesso, contudo interagem com o ambiente, liberando materiais que poderiam ser usados numa pesquisa indireta de sua eventual infecção malárica. A Serra da Cantareira em São Paulo tem histórico de malária associada ao símio *Alouatta guariba clamitans* e ao vetor *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Pesquisa recente evidenciou o DNA de plasmódios nas fezes dos bugios da área e observou a presença de besouros coprófagos. Com a hipótese de que o DNA dos plasmódios poderia contaminar estes besouros coprófagos que seriam potenciais indicadores indiretos da circulação de plasmódios nos símios, esse estudo visou coletar fezes de bugios e identificar os besouros Scarabaeinae associados em três parques de São Paulo, Parque Estadual da Cantareira (PEC), Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL) e Instituto de Botânica (IBot). Realizamos coletas mensais entre dezembro de 2016 a junho de 2019, perfazendo um total de 225 amostras de fezes e 230 de besouros. A origem símia das fezes foi confirmada pela presença do gene *cyt b* de *Alouatta* em 54% das amostras de fezes coletadas e em 69% do conteúdo intestinal dos besouros. Na detecção molecular para *Plasmodium*, encontramos positividade em 2,7% nas fezes dos bugios de todos os parques, PEC e PEAL 6/149 e IBot 0/76. Os conteúdos intestinais de besouro apresentaram uma positividade de 7%, PEC e PEAL 11/143 e IBot 5/87. Os besouros nos quais foram detectados o DNA do plasmódio foram: *Onthophagus haematopus* e *Canthon aff. Ibarragrassoi* e a espécie *Onthophagus haematopus* apresentou maior positividade para plasmódios no conteúdo intestinal. Nossos dados sugerem que é possível que os besouros funcionem como um filtro biológico que retira contaminantes e interferentes e aumenta a eficiência de detecção molecular de plasmódio. Os resultados demonstraram que os besouros *Onthophagus haematopus* e *Canthon aff. ibarragrassoi* estão associados às fezes de bugio e poderão ser utilizados como bioindicadores de *Plasmodium*, evidenciando a circulação de macacos infectados em áreas com transmissão zoonótica. Essa



nova abordagem ambiental sem agredir os sítios protegidos, poderá auxiliar as atividades de Vigilância da malária em área de Mata Atlântica.

Descritores: *Plasmodium*. *Alouatta* - Mata Atlântica. Scarabaeidae. Bioindicadores.

## ABSTRACT

Silva F S. Detection of *Plasmodium* spp. by environmental DNA (eDNA) associated with the interaction among howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) and coprophage beetles (Coleoptera, Scarabaeidae) in areas of malaria transmission in the Atlantic Forest (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo; 2019.

Simians are protected primates of which blood sample collection is hard to perform, however their feces might be used to the indirect screening of malarial infection. Serra da Cantareira, located in São Paulo, has a history of malaria associated with the simian *Alouatta guariba clamitans* and the vector *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. *Plasmodium* DNA has recently been detected in the feces of howler monkeys from this area. Besides, coprophage beetles were also found. In order to confirm the hypothesis that these coprophage beetles could carry *Plasmodium* DNA and therefore could be considered indirect indicators of *Plasmodium* circulation in simians, the present study aimed to identify Scarabaeinae beetles associated with feces of howler monkeys from three parks in São Paulo: Cantareira State Park (PEC), Alberto Löfgren State Park (PEAL) and Botanical Institute (IBot). A total of 225 fecal samples and 230 beetles were collected from december/2016 to june/2019. The simian origin of the feces was confirmed by the presence of the cyt b gene of *Alouatta* in 54% of the stool samples and in 69% of the intestinal content of the beetles. *Plasmodium* was detected in 2,7% of the stool samples of howler monkeys (4% in PEC and PEAL and 0% in IBot) and 7% of the intestinal content of beetles (7,7% in PEC and PEAL and 5,7% in IBot). *Plasmodium* DNA was detected in the beetles *Canthon aff. Ibarragrassoi* and *Onthophagus haematopus*, although the last specie showed greater positivity. Our data suggests it is possible that beetles work as biological filters that remove contaminants from the ingested feces and enhance the efficiency of *Plasmodium* molecular detection. The results showed that the beetles *Onthophagus haematopus* and *Canthon aff. ibarragrassoi* are associated with the feces of howler monkeys and that they can be used as *Plasmodium* bioindicators, showing the circulation of infected monkeys in areas with zoonotic transmission. This new environmental approach could be used during Malaria Surveillance in the Atlantic Forest without harming protected simians.

Descriptors: *Plasmodium*. *Alouatta* – Atlantic Forest. Scarabaeidae. Bioindicators.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do plasmódio.....	2
Figura 2 - Vetor <i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> .....	11
Figura 3- Bromélia <i>Vriesea</i> sp.....	12
Figura 4- Distribuição geográfica da espécie <i>Alouatta guariba clamitans</i> .....	15
Figura 5- Bugio macho, PEC - Núcleo Pedra Grande – SP.....	16
Figura 6 - Bugio fêmea, PEC - Núcleo Pedra Grande – SP.....	17
Figura 7- Características morfológicas dorsais de um besouro Scarabaeinae.....	21
Figura 8- Características morfológicas ventrais de um besouro Scarabaeinae.....	21
Figura 9 - Besouro com comportamento de paracoprismo no IBot, São Paulo.....	22
Figura 10- Imagem do PEC e PEAL.....	27
Figura 11 - Imagem do Instituto de Botânica- IBot.....	29
Figura 12- Coleta de fezes de Bugio no PEC - Núcleo Pedra Grande.....	30
Figura 13- Fezes de bugio caídas no solo - Instituto de Botânica - IBot – SP.....	31
Figura 14 - Identificação taxonômica dos besouros no Museu de Zoologia da USP.....	32
Figura 15- Eletroforese em gel de agarose a 2% - Nested PCR com os primers PfF3700/PfR4615 e PfF3700/PfR4102 para amplificação de fragmento do gene de <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> (402 bp).....	40
Figura 16- Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR com os primers PfAlBr e PrAlBr para amplificação de fragmento do gene de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta guariba clamitans</i> (580 pb).....	41
Figura 17 - Fotos de besouros coprófagos coletados no PEC e PEAL.....	45
Figura 18 - Dissecção de intestino de <i>Canthon aff. ibarragrassoi</i> .....	49
Figura 19 – Comparação das quantidades de fezes no interior do intestino de dois exemplares de Scarabaeinae.....	50
Figura 20- Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta g. clamitans</i> em fezes coletadas no PEC e PEAL.....	51
Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta g. clamitans</i> em conteúdo intestinal de besouros coprófagos.....	55

Figura 22- Eletroforese em gel de agarose a 2% - PCR para amplificar o fragmento do gene <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> (402 bp) em conteúdo intestinal de besouros do PEC e PEAL.....	63
Figura 23 – Filogenia das seqüências de <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> das amostras de conteúdo intestinal de besouros do PEC e PEAL.....	68
Figura 24- Placa teste para sangue oculto nas fezes com amostras do PEC e PEAL.....	69
Figura 25 - Fotos dos besouros coprófagos coletados no IBot.....	72
Figura 26- Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR para amplificar o fragmento de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta g. clamitans</i> em fezes coletadas no IBot.....	75
Figura 27- Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR para amplificar o fragmento do gene de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta g. clamitans</i> em conteúdo intestinal de besouro.....	76
Figura 28- Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR para amplificar o fragmento do gene de <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> em conteúdo intestinal de besouro do IBot.....	79

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Dados relacionados com os casos autóctones na região Extra-Amazônica *P. vivax*..... 3
- Gráfico 2- Padronização da PCR em tempo real para *P. malariae*, *P. brasilianum* para amplificação de fragmento do gene 18S rRNA .....39
- Gráfico 3- Padronização da PCR em tempo real para *Plasmodium vivax*, *Plasmodium simium* para amplificação de fragmento do gene 18S rRNA.....39
- Gráfico 4- Espécies de besouros e número de exemplares coletados por busca ativa nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* no PEC e PEAL.....42
- Gráfico 5- Teste exato de Fisher sugerindo forte associação de *Canthon aff. ibarragrasoi* com os ambientes preservados ( $p < 0.001$ ).....44
- Gráfico 6- PCR em tempo real para fezes de bugio, amostra 303 *P. vivax*, *P. simium*, amplificação do fragmento do gene 18S rRNA..... 53
- Gráfico 7- PCR em Tempo Real para amplificação do fragmento do gene 18SrRNA de *Plasmodium malariae/P. brasilianum* em amostras de DNA de fezes de bugios do PEC e PEAL.....54
- Gráfico 8- Teste exato de Fisher sugerindo forte associação de *Canthon aff. ibarragrasoi* às fezes de bugios ( $p < 0.001$ )..... 56
- Gráfico 9 - Teste de Fisher sugerindo forte associação entre conteúdos intestinais de besouros “repletos” de fezes e melhor detecção de *cyt b* de *Alouatta* ( $p < 0.001$ ).....58
- Gráfico 10- PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA de *Plasmodium malariae/P. brasilianum* em três amostras de conteúdo intestinal besouro do PEC e PEAL (262-1, 291 e 303-5) .....60
- Gráfico 11- PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA de *Plasmodium malariae/P. brasilianum* em uma amostra de conteúdo intestinal de besouro do PEC e PEAL.....61
- Gráfico 12- PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA de *Plasmodium vivax/P. simium* em três amostras de intestino de besouro do PEC e PEAL.....62
- Gráfico 13- Teste de Fisher não relaciona “frescor” das fezes com a detecção de *cyt b* de *Alouatta* ( $p = 0.607$ ).....65
- Gráfico 14 - Teste de Fisher não relaciona “frescor” das fezes com a detecção de *cyt b* de *Plasmodium* ( $p = 1$ ).....67
- Gráfico 15 - Espécies de besouro e número de exemplares coletados por busca ativa nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* no Instituto de Botânica (IBot)..... 70
- Gráfico 16- PCR em tempo real para amplificação de fragmento do gene 18S rRNA de *Plasmodium vivax/simum* em uma amostra de conteúdo intestinal de besouro do IBot..... 79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Infecção por malária e ano de sintomas no Estado de São Paulo (2017-2019)..	4
Tabela 2- Plasmódios segundo data da primeira observação em símios.....	6
Tabela 3- <i>Primers</i> utilizados para amplificação de <i>Plasmodium</i> em amostras de DNA obtidas de fezes de bugio e de conteúdo intestinal de besouro coprófago em PCR em tempo real no sistema Taqman.....	35
Tabela 4- <i>Primers</i> utilizados para amplificação de <i>Plasmodium</i> em amostras de fezes de bugios e conteúdo intestinal de besouro coprófago em Nested PCR, Siregar <i>et al.</i> <sup>49</sup> .....	36
Tabela 5- Besouros Scarabaeinae coletados nas fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> no PEC e PEAL entre 12/2016 e 12/2017.....	43
Tabela 6- Amostras de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> com mais de uma espécie de besouro coletada no PEC e PEAL.....	46
Tabela 7- Observação do comportamento das espécies de besouros Scarabaeinae coletados em busca ativa no PEC e PEAL.....	47
Tabela 8- Número de besouros coprófagos coletados no PEC e PEAL submetidos a dissecação intestinal para avaliação do conteúdo fecal.....	48
Tabela 9- Resultados das cinco amostras de DNA de fezes de bugio do PEC e PEAL positivas nos testes moleculares.....	52
Tabela 10- Comparação entre os resultados da avaliação da quantidade de conteúdo fecal de intestino de besouros coprófagos coletados no PEC e PEAL e a PCR de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta g. clamitans</i> .....	57
Tabela 11- Resultados dos testes moleculares com DNA extraído do conteúdo intestinal dos besouros coletados nas fezes de <i>Alouattta guariba clamitans</i> do PEC e PEAL.....	59
Tabela 12- Característica das amostras de fezes de bugios consumidas pelos besouros coprófagos que foram positivos para <i>Plasmodium</i> no momento da coleta no PEC e PEAL.....	64
Tabela 13- Resultados comparados entre as amostras positivas de fezes de bugios e/ou conteúdo intestinal de besouros nos testes moleculares.....	66
Tabela 14- Besouros Scarabaeinae coletados nas fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> no IBot em coletas realizadas entre 08/2018 e 06/2019.....	71
Tabela 15- Amostras de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> com mais de uma espécie de besouro coletada no IBot.....	73

Tabela 16- Observação do comportamento das espécies de besouros Scarabaeinae coletados em busca ativa no IBot.....	73
Tabela 17- Número de besouros coletados no IBot que foram dissecados e avaliados de acordo com a observação da quantidade de fezes no intestino.....	74
Tabela 18- Comparação entre resultados da avaliação da quantidade de conteúdo intestinal e do teste para detecção de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta guariba clamitans</i> nos besouros coletados no IBot.....	77
Tabela 19- Resultados dos testes moleculares com as amostras de conteúdo intestinal dos besouros coletados nas fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> no IBot.....	78
Tabela 20- Características das amostras de fezes consumidas pelos besouros coprófagos que foram positivos para plasmódio no IBot.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SINANNET-CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac
18S rRNA	18S Ribosomal RNA
CSP	<i>Circunsporozoite protein</i> (Proteína circunsporozoíto)
eDNA	<i>Enviromental DNA</i> (DNA ambiental)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
Cyt b	Citocromo b
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Taq	Polimerase termoestável
TBE	Solução Tampão Tris/Borato/EDTA
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local)
Nest	<i>Nested</i> (Ninho)
GPS	Global Position System (Sistema de Posicionamento Global)
UV	Ultravioleta
PNH	Primata não humano
<i>P<sub>s</sub></i>	<i>Plasmodium simium</i>
<i>P<sub>v</sub></i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P<sub>b</sub></i>	<i>Plasmodium brasilianum</i>
<i>P<sub>m</sub></i>	<i>Plasmodium malariae</i>
PEAL	Parque Estadual Alberto Löfgren
PEC	Parque Estadual da Cantareira
IBot	Instituto de Botânica
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo



## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

$\mu\text{l}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
%	porcentagem
Pb	par de base
cm	centímetro
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A MALÁRIA.....	1
1.2 PLASMÓDIOS SÍMIOS.....	5
1.3 <i>Plasmodium brasilianum</i> .....	7
1.4 <i>Plasmodium simium</i> .....	8
1.5 A SEMELHANÇA ENTRE OS PLASMÓDIOS SÍMIOS E PLASMÓDIOS HUMANOS.....	8
2 VETORES DA MALÁRIA.....	10
3 A DETECÇÃO de <i>Plasmodium</i> em reservatórios primatas não humanos nos estudos epidemiológicos Métodos invasivos versus não invasivos.....	13
4 Bugio-Ruivo, <i>Alouatta guariba clamitans</i> (CABRERA, 1940) e seu papel como reservatório de plasmódios.....	15
4.1 A RELAÇÃO ENTRE OS MACACOS E OS BESOUROS COPRÓFAGOS.....	17
4.1.1 Recursos alimentares dos besouros Scarabaeidae.....	17
5 ALGUNS ASPECTOS da biologia de Scarabaeinae.....	19
6 JUSTIFICATIVA.....	23
7 OBJETIVOS GERAIS.....	25
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
8 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
8.1 ÁREAS DE ESTUDO.....	26
8.1.1 Serra da Cantareira.....	26
8.2 Instituto de Botânica de São Paulo (IBot).....	28
8.3 COLETAS DAS FEZES DOS BUGIOS E DOS BESOUROS COPRÓFAGOS NO PEC, PEAL E IBOT.....	29
8.4 Dissecção e identificação do conteúdo intestinal do besouro coprófago e identificação taxonômica.....	31
8.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE FEZES DE BUGIOS.....	33
8.6 EXTRAÇÃO DE DNA DO CONTEÚDO INTESTINAL DOS BESOUROS COPRÓFAGOS.....	33

8.7 PCR para detecção do DNA de <i>Alouatta</i> nas fezes dos bugios ( <i>Alouatta guariba clamitans</i> ) e do conteúdo intestinal dos besouros Scarabaeidae.....	33
8.7.1 Descrição da Reação.....	33
8.8 PCR em Tempo Real (TaqMan) para detecção de DNA de plasmódios nas amostras de fezes de Bugios ( <i>Alouatta guariba clamitans</i> ) e no conteúdo intestinal dos besouros Scarabaeidae	34
8.8.1 Descrição da Reação.....	34
8.9 “Nested PCR” para detecção de identificação molecular de plasmódio nas amostras de fezes de Bugios ( <i>Alouatta guariba clamitans</i> ) e no conteúdo intestinal dos besouros Scarabaeidae	35
8.9.1 Descrição da reação.....	35
8.10 Análises das sequências de DNA de plasmódios obtidas a partir de fragmento sequenciado do gene de <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> .....	36
8.11 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO .....	37
8.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
9 RESULTADOS .....	38
9.1 PADRONIZAÇÃO DOS TESTES MOLECULARES .....	38
9.1.1 Padronização da PCR em tempo real (TaqMan) para amplificação do fragmento 18 S rRNA de <i>Plasmodium</i> .....	38
9.2 Padronização da Reação Nested-PCR (convencional) para amplificação de fragmento de <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> .....	40
9.3 Padronização da PCR para detecção de fragmento de <i>cyt b</i> de <i>Alouatta guariba clamitans</i> (bugio) e <i>Brachyteles</i> (Muriqui).....	40
10 Resultados de coleta de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> (Bugio) e de besouros no Parque Estadual da Cantareira (PEC) e no Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL) – classificação taxonômica, comportamento e número de exemplares de besouros coletados.....	42
10.1 DISSECÇÃO DO CONTEÚDO INTESTINAL DOS BESOUROS COPRÓFAGOS.....	48
10.2 Resultados das análises moleculares para detecção de <i>Plasmodium</i> nas amostras de fezes de bugios ( <i>Alouatta guariba clamitans</i> ) e de besouros coprófagos do PEC e PEAL .....	50
10.2.1 Resultados das análises moleculares das amostras de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> ....	50
10.2.2 Resultados dos testes moleculares com amostras de DNA dos conteúdos intestinais de besouros .....	55
10.2.3 Resultados comparativos entre as amostras de fezes de bugios e os besouros positivos para <i>Plasmodium</i> .....	63
10.2.4 Identificação molecular das amostras de besouros com conteúdo intestinal positivo para <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> .....	68

10.2.5 Teste de sangue oculto nas amostras de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> do PEC e PEAL (Teste Rápido Imunocromatográfico).....	69
10.3 Besouros coletados nas fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> (bugios) no Instituto de Botânica de São Paulo (IBot).....	69
10.3.1 Resultados das análises moleculares para detecção de <i>Plasmodium</i> nas amostras de fezes de bugios ( <i>Alouatta guariba clamitans</i> ) e de besouros coprófagos do IBot .....	74
10.3.2 Resultados das amostras de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> .....	74
10.3.3 Resultados de <i>cyt b</i> de plasmódio e 18s rRNA (Taqman) nas amostras de fezes coletadas no IBot.....	75
10.3.4 Resultados dos testes moleculares com amostras de DNA dos conteúdos intestinais de besouros .....	75
10.3.5 Resultados comparativos das amostras de fezes e besouros positivas para <i>Plasmodium</i> , coletadas no IBot.....	80
10.3.6 Teste de sangue oculto nas amostras de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> do IBot (Teste Rápido Imunocromatográfico).....	80
11 DISCUSSÃO .....	81
12 CONCLUSÕES .....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS .....	100

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A malária

A malária, conhecida pelos nomes de impaludismo, maleita, febre terçã, febre palustre entre outros, é uma doença infecciosa febril aguda, causada por agentes etiológicos do filo Apicomplexa, do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos no momento do repasto sanguíneo pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, segundo Forattini <sup>1</sup> e Guia de Vigilância em Saúde <sup>2</sup>.

Há conhecimento de aproximadamente 100 espécies de plasmódios, sendo que algumas podem infectar macacos, aves, répteis, roedores e humanos. Dentre essas, há 5 espécies de *Plasmodium* que podem infectar o ser humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, restrito ao continente africano e *Plasmodium knowlesi*, que tinha como hospedeiros naturais macacos do sudeste asiático, porém atualmente causa doença em humanos <sup>3,2</sup>.

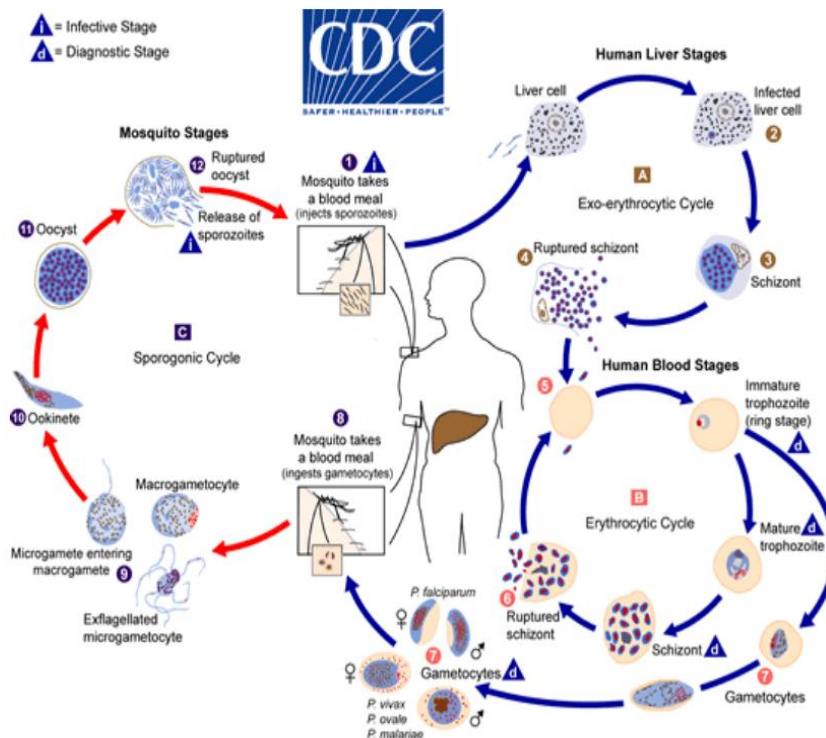
Os sintomas da doença são caracterizados por: febre seguida de calafrios, sudorese, fraqueza e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie do plasmódio <sup>4</sup>.

O ciclo se inicia no humano (hospedeiro intermediário) quando os esporozoítos (formas infectantes) presentes na glândula salivar da fêmea do mosquito *Anopheles*, são inoculados durante o repasto sanguíneo (Figura 1). Esses migram via corrente sanguínea até o fígado, invadem os hepatócitos e se multiplicam assexuadamente (esquizogonia pré-eritrocítica ou ciclo pré-eritrocítico). Os esquizontes rompem os hepatócitos e os merozoítos liberados na corrente sanguínea, invadem as hemácias, iniciando o ciclo sanguíneo. Os esquizontes sanguíneos se desenvolvem e rompem as hemácias liberando os merozoítos que invadem novamente outras hemácias. Nesse estágio, ocorre o surgimento dos sintomas, com picos febris variando de 24, 48 ou 72 horas, (varia conforme a espécie do parasita). Depois de alguns ciclos sanguíneos, algumas formas dentro das hemácias já não se dividem e se diferenciam em gametócitos.

No ciclo sexuado, a fêmea do mosquito *Anopheles* (hospedeiro definitivo) ao fazer o repasto em uma pessoa infectada, ingere as formas presentes no sangue, que serão digeridas no estômago do inseto, com exceção dos gametócitos, que se diferenciarão em

macrogametócito e microgametócito (esse último, após a ocorrência de três mitoses). Quando os gametas se unem formando o zigoto, se inicia o deslocamento por movimentos amebóides do oocineto, que após a sua aderência ao epitélio intestinal, se transforma em oocisto. Um envoltório protetor é segregado e se inicia a multiplicação esporogônica, gerando os esporozoítos. O oocisto maduro se rompe e os esporozoítos caem na hemolinfa, migrando até as glândulas salivares no vetor, repetindo o ciclo de transmissão do parasita.

O tempo entre a picada do mosquito e o surgimento dos primeiros sintomas, varia de acordo com a espécie do plasmódio, podendo ser de 7 a 10 dias para *P. falciparum*, de 10 a 15 dias para *P. vivax* e de 30 dias para *P. malariae*<sup>3,5,6</sup>.

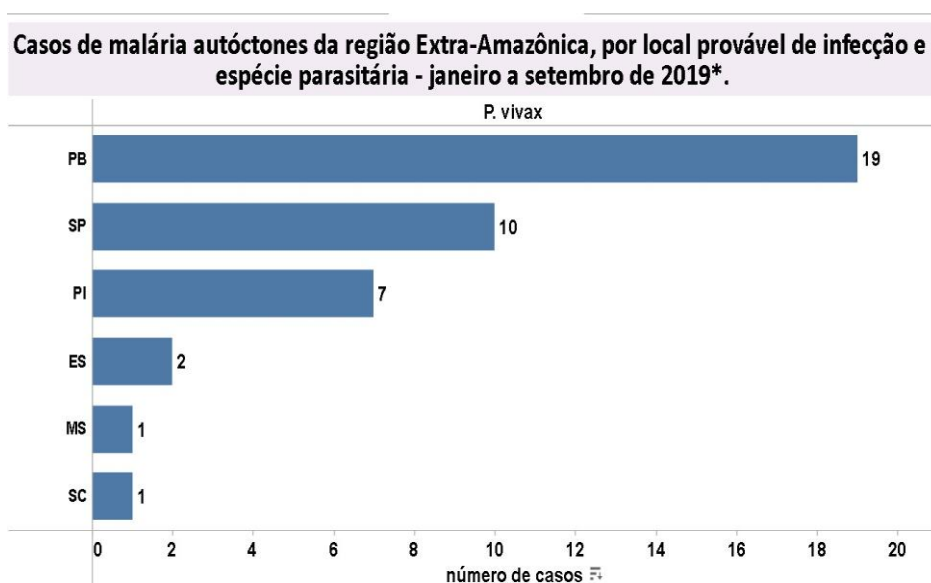


**Figura 1- Ciclo de vida do plasmódio**

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention - CDC<sup>103</sup>

Os parasitos que ocorrem no Brasil são o *Plasmodium vivax*, o *P. malariae* e o *P. falciparum*, sendo que o *P. vivax* (febre terçã benigna, com maior distribuição mundial) e *P. falciparum* (febre terçã maligna de 48 horas, perigoso se não tratado precocemente) apresentam maior ameaça à saúde<sup>2,4,7</sup>.

No Brasil, a Região Amazônica ainda apresenta uma elevada incidência de casos de malária, uma vez que nos anos de 2018 e até setembro de 2019, foram registrados 193.838 e 117.724 casos da doença, respectivamente. Dentre os casos ocorridos até setembro de 2019, 105.482 deles foram ocasionados por *P. vivax*, 11.360 por *P. falciparum*, 20 foram por *P. malariae* e 862 casos por malária mista. Contudo, na região extra-amazônica ocorrem casos autóctones esporádicos de malária em áreas com cobertura de Mata Atlântica<sup>8</sup>. Nessa região, no ano de 2018 e até setembro de 2019, ocorreram 244 e 40 casos de malária, respectivamente, sendo que no estado de São Paulo foram registrados 10 casos por *P. vivax* (Gráfico 1)<sup>104</sup>.



**Gráfico 1- Dados relacionados com os casos autóctones na região Extra-Amazônica *P.vivax***  
 Dados atualizados em 30/09/2019  
 Fonte: Ministério da Saúde<sup>104</sup>

Conforme relatado anteriormente, no estado de São Paulo ocorrem casos autóctones esporádicos de malária em áreas com cobertura de Mata Atlântica (Tabela 1), especialmente em regiões do Vale do Ribeira, Bacia do Alto Tietê e Litorais Norte e Sul do estado<sup>9</sup>.

**Tabela 1- Infecção por malária e ano de sintomas no Estado de São Paulo (2017-2019)**

<b>Município provável infecção</b>	<b>de</b>	<b>2017*</b>	<b>%</b>	<b>2018*</b>	<b>%</b>	<b>2019*</b>	<b>%</b>
		<b>Nº de casos</b>		<b>Nº de casos</b>		<b>Nº de casos</b>	
Bertioga		1	6,3	0	0,0	0	0,0
Biritiba- Mirim		1	6,3	1	11,1	0	0,0
Cananéia		0	0,0	0	0,0	1	12,5
Caraguatatuba		6	37,5	1	11,1	0	0,0
Eldorado		1	6,3	0	0,0	0	0,0
Iporanga		1	6,3	0	0,0	1	12,5
Juquitiba		0	0,0	1	11,1	0	0,0
Miracatu		0	0,0	0	0,0	2	25,0
Natividade da Serra		0	0,0	1	11,1	2	25,0
Paraibuna		0	0,0	0	0,0	1	12,5
Salesópolis		0	0,0	1	11,1	0	0,0
São Sebastião		4	25,0	4	44,4	2	12,5
Ubatuba		2	12,5	0	0,0	0	0,0
<b>Total</b>		<b>16</b>	<b>100,0</b>	<b>9</b>	<b>100,0</b>	<b>9</b>	<b>100,0</b>

Dados atualizados em 12/09/2019

Fonte: CVE<sup>9</sup>

Os casos autóctones demonstrados na tabela 1 ocorreram entre populações humanas residentes ou que transitam em áreas urbanas ou rurais da Mata Atlântica, sendo o *Plasmodium vivax* o agente etiológico identificado em exame microscópico. A maioria dos pacientes são assintomáticos ou oligossintomáticos e os plasmódios são identificados por meio do diagnóstico da gota espessa em baixas parasitemias<sup>10, 11, 12</sup>.

Em áreas da Mata Atlântica de São Paulo e na região montanhosa do Espírito Santo, estudos sorológicos indicaram a presença de anticorpos contra esporozoítos e formas



sanguíneas nas populações residentes de acordo com Carvalho *et al.*<sup>13</sup>, Curado *et al.*<sup>14</sup>, Curado *et al.*<sup>15</sup> e Cerutti *et al.*<sup>16</sup>, demonstrando que a ocorrência dos casos está relacionada às atividades humanas próximas às áreas florestadas. Apesar do diagnóstico morfológico por meio da gota espessa (preconizado pela OMS) apontar para a ocorrência de *P. vivax*, pesquisas realizadas através de técnicas moleculares, demonstraram a circulação no Vale do Ribeira de *P. malariae* e *P. falciparum*, este último a ser elucidado, pois não existe até o momento o registro de casos humanos autóctones por tal parasito, sugerindo a existência de um protozoário assemelhado que não causa a doença da forma que conhecemos<sup>15,16,17</sup>.

As pesquisas realizadas até o momento sugerem a ocorrência de quadro silencioso de transmissão envolvendo portadores assintomáticos humanos e/ou reservatórios símios, principalmente bugios, gênero *Alouatta*, que albergam plasmódios assemelhados aos parasitos humanos e que poderiam contribuir em uma situação de zoonose<sup>18,19,20</sup>.

## 1.2 Plasmódios símios

A descoberta da malária em primatas ocorreu concomitantemente com a descoberta do mosquito vetor da malária, por volta do ano de 1899. Os plasmódios símios descritos até o momento, chegam a 27 espécies (Tabela 02)<sup>21</sup>.

O ciclo de vida dos plasmódios símios é similar ao dos parasitos humanos, sendo que também são transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles*, que inoculam esporozoítas no momento do repasto sanguíneo, atingindo o fígado, dando origem ao ciclo exoeritrocítico, até o momento de liberar os merozoítas na circulação sanguínea. Os plasmódios completam o ciclo assexuado em 24, 48 ou 72 horas, dependendo da espécie do parasita. O ciclo sexuado ocorre logo após a fase aguda da infecção, originando os gametócitos, forma infectante para o mosquito<sup>22,23</sup>.

Os *Plasmodium simium*, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi*, *P. inui* e *P. knowlesi*, são espécies que causam malária em símios e que já infectaram humanos, tanto em infecções naturais, quanto experimentais ou acidentais<sup>7</sup>.

**Tabela 2- Plasmódios segundo data da primeira observação em símios**

Região (nº. espécies)	Espécie	Data 1 <sup>o</sup> observação	Subgênero	Hospedeiro (descrição)
Ásia (13)	<i>Plasmodium pitheci</i>	1905	<i>Plasmodium</i>	Orangotango ( <i>Pongo pygmaeus</i> )
	<i>Plasmodium inui</i>	1905	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca fascicularis</i> )
	<i>Plasmodium cynomolgi</i>	1905	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca fascicularis</i> )
	<i>Plasmodium eylesi</i>	1965	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Hylobates lar</i> )
	<i>Plasmodium hylobati</i>	1939	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Hylobates leuciscus</i> )
	<i>Plasmodium jefferyi</i>	1964	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Hylobates lar</i> )
	<i>Plasmodium youngi</i>	1964	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Symphalangus syndactylus</i> )
	<i>Plasmodium fieldi</i>	1962	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca nemestrina</i> )
	<i>Plasmodium simiovale</i>	1965	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca sinica</i> )
	<i>Plasmodium coatneyi</i>	1965	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )
	<i>Plasmodium fragile</i>	1965	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca radiata</i> )
	<i>Plasmodium knowlesi</i>	1932	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca fascicularis</i> )
	<i>Plasmodium silvaticum</i>	1972	<i>Plasmodium</i>	Orangotango ( <i>Pongo pygmaeus</i> )
África (10)	<i>Plasmodium gonderi</i>	1908	<i>Plasmodium</i>	Mangaby ( <i>Cercocebus atys</i> )
	<i>Plasmodium schwetzi</i>	1920	<i>Plasmodium</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium rodhaini</i>	1939	<i>Plasmodium</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium carteri</i>	2016	<i>Plasmodium</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium reichenowi</i>	1922	<i>Laverania</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium gaboni</i>	2009	<i>Laverania</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium billcollinsi</i>	2010	<i>Laverania</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium praefalciparum</i>	2011	<i>Laverania</i>	Gorila ( <i>Gorilla gorilla</i> )
	<i>Plasmodium adleri</i>	2011	<i>Laverania</i>	Gorila ( <i>Gorilla gorilla</i> )
	<i>Plasmodium blacklocki</i>	2011	<i>Laverania</i>	Gorila ( <i>Gorilla gorilla</i> )
América (2)	<b><i>Plasmodium brasilianum</i></b>	<b>1908</b>	<b><i>Plasmodium</i></b>	<b>Macaco inglês (<i>Cacajao calvus</i>)</b>
	<b><i>Plasmodium simium</i></b>	<b>1939</b>	<b><i>Plasmodium</i></b>	<b>Bugio (<i>Alouatta fusca</i>)</b>
Madagascar (2)	<i>Plasmodium lemuris</i>	1963	<i>Vinckeia</i>	Lêmure ( <i>Lemur collaris</i> )
	<i>Plasmodium girardi</i>	1952	<i>Vinckeia</i>	Lêmure ( <i>Lemur fulvus rufus</i> )

Fonte: Martinelli e Culleton<sup>21</sup>

A malária símia no Brasil ganhou destaque a partir da década de 1960 por meio das publicações dos estudos realizados pelo professor Dr. Leônidas Deane e colaboradores, sendo que suas pesquisas evidenciaram a presença de plasmódios nos macacos silvestres brasileiros. Na região amazônica foi observado um percentual de 10%, com dominância de 99% por *Plasmodium brasilianum*. O *Plasmodium simium* não foi detectado nos macacos da região norte. Na Mata Atlântica das regiões Nordeste e Centro-Oeste, o *P. brasilianum* e o *P. simium* não foram detectados em nenhuma lâmina de esfregaço de sangue. Já na Mata Atlântica da região Sul, a positividade dos macacos infectados foi de 17,9%, sendo o *Plasmodium simium* o mais frequente (48,4%). O *P. brasilianum* atingiu um percentual de 33,3%. Na região Sudeste, dos 764 macacos examinados, 35,6% deles estavam infectados, sendo o *P. brasilianum* o mais frequente com 46,3% dos casos e o *P. simium* com 37,5%. O macaco do gênero *Alouatta* foi mais frequentemente infectado por *Plasmodium brasilianum* e *P. simium*

24.

### **1.3 *Plasmodium brasilianum***

O *Plasmodium brasilianum* foi encontrado no sangue de um macaco originário da região Amazônica, o Uacari vermelho (*Cacajao calvus*). Essa amostra foi enviada para a Alemanha e classificada por Gonder e Von Berenberg- Gossler, em 1908, que observaram semelhanças morfológicas desse parasito com o já conhecido *Plasmodium malariae*, parasito humano.

O ciclo assexuado desse parasito perfaz 72 horas. Em estudos experimentais, os níveis parasitêmicos apresentaram variáveis entre as espécies de macacos. Em hospedeiros naturais a parasitemia normalmente é subpatente, sendo a infecção assintomática. O *P. brasilianum* é considerado um modelo experimental devido às suas similaridades biológicas com *P. malariae* e por se desenvolver em diferentes macacos do Novo Mundo<sup>22,23</sup>.

## 1.4 *Plasmodium simium*

O *Plasmodium simium* foi detectado em um macaco bugio da espécie *Alouatta fusca* na região de Itapeperica da Serra, São Paulo em 1939, durante estudo sobre a febre amarela<sup>25</sup>.<sup>23</sup> O *P. simium* também foi encontrado em bugios dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e em muriquis (*Brachyteles arachnoides*) no estado do Espírito Santo<sup>23,26,27</sup>.

O ciclo assexuado desse parasito perfaz 48 horas. A parasitemia apresenta-se bastante variável entre as diversas espécies de macacos infectadas experimentalmente. O *P. simium* foi utilizado como modelo biológico para *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*<sup>22,23</sup>.

Um caso de infecção natural por *Plasmodium simium* em humano no Brasil ocorreu em um guarda florestal do Parque Estadual da Cantareira que auxiliava o Prof. Deane na coleta entomológica nas copas das árvores<sup>28</sup>. Recente pesquisa realizada em área de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro demonstrou que casos humanos autóctones ocorridos entre 2015 e 2016 foram causados por *P. simium*, evidenciando a transmissão zoonótica. A análise completa do DNA mitocondrial permitiu verificar que as sequências genômicas de plasmódio das amostras dos pacientes eram idênticas às sequências de *P. simium* depositadas no Genbank<sup>20</sup>.

## 1.5 A semelhança entre os plasmódios símios e plasmódios humanos

Devido à semelhança morfológica e molecular entre *P. simium* e *P. brasilianum* (parasitos símios), e *P. vivax* e *P. malariae* (parasitos humanos), foi sugerida a existência de uma relação zoonótica entre essas espécies, sustentada pela hipótese de que o macaco do gênero *Alouatta* é um dos mais suscetíveis ao plasmódio, sendo um reservatório potencial em áreas de malária humana autóctone na Mata Atlântica<sup>24</sup>. Os estudos moleculares corroboram essa hipótese, uma vez que indicaram similaridade no DNA ribossômico (18S rRNA), no DNA mitocondrial e na proteína circumsporozoíta (CSP) e entre *P. vivax/P. simium* e *P. malariae/P. brasilianum*<sup>29-36</sup>.

Evidências obtidas em estudos parasitológicos e sorológicos realizados em populações de macacos amazônicos e de Mata Atlântica mostram que macacos apresentam anticorpos contra formas sanguíneas e contra esporozoítas e apresentam plasmódios no sangue, muitas vezes em baixa parasitemia ou somente detectáveis na reação de polimerização em cadeia

(PCR), reforçando a concepção da atuação desses animais como reservatórios<sup>19, 24, 29, 30, 34, 37,</sup>  
40.

## 2 Vetores da malária

Os mosquitos anofelinos pertencem a família Culicidae e subfamília Anophelinae. Os subgêneros de maior importância epidemiológica são *Kerteszia* e *Nyssorhynchus*<sup>1</sup>.

Os anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus*, utilizam como criadouros para as suas larvas, grandes coleções de água limpa ensolaradas ou parcialmente sombreadas (lagoas, açudes, represas e bolsões formados nas curvas dos rios). Na região amazônica brasileira, a principal espécie de importância epidemiológica é o *Anopheles Nyssorhynchus darlingi*, esse mosquito tem comportamento antropofílico e endofílico, ou seja, pode procurar o sangue humano dentro das residências nas primeiras horas da noite. E de acordo com algumas pesquisas, o mesmo já foi detectado infectado naturalmente com os três principais plasmódios, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*<sup>84</sup>.

Outros mosquitos anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus*, também possuem importância epidemiológica, entre eles: *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles deaneorum*, *Anopheles braziliensis*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles triannulatus*, *Anopheles oswaldoi*. Além dos anofelinos citados, outras espécies, como *An. strodei*, *An. evansae* e *An. galvaoi* têm sido esporadicamente detectadas com infecção natural por plasmódio, porém recebem pouca atenção dos especialistas, por serem essencialmente zoofílicos e exófilos, ou seja, vetores auxiliares (espécies secundárias)<sup>1,7,84</sup>.

Os anofelinos do subgênero *Kerteszia* utilizam como criadouros para as suas larvas "recipientes naturais", principalmente em água que se acumula nos verticilos de bromélias, esses vetores também apresentam dispersão vertical. Os mosquitos do subgênero *Kerteszia* são considerados os vetores primários da malária, no sul do Brasil, litoral fluminense e paulista, junto à Serra do mar<sup>84</sup>.

Os principais vetores responsáveis pela transmissão da malária humana e símia em áreas de Mata Atlântica são os mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (figura 02) e *Anopheles (Kerteszia) bellator*. Em especial o *An. (Kerteszia) cruzii*, que também apresenta na fase imatura, larvas que se desenvolvem em água acumulada nos verticilos de bromélia, em um quadro conhecido como malária-bromélia (figura 03)<sup>41,84</sup>.

Conforme descrito por Deane, o *An. cruzii* apresenta dispersão vertical, comportamento que possibilita às fêmeas adultas se alimentarem tanto no nível da copa quanto no solo, possibilitando a transmissão dos plasmódios entre símios e humanos<sup>42,84</sup>.

Na Serra da Cantareira foi observado que não havia transmissão da malária humana, pois, os *Anopheles (Kerteszia) cruzii* foram encontrados em sua maioria nas copas das árvores. Mas, pesquisas realizadas nos estados do Espírito Santo e Santa Catarina, demonstraram que as fêmeas dessa espécie se alimentavam tanto na copa quanto no solo, fato que explica a transmissão da malária humana localmente <sup>42</sup>.

Mosquitos vetores do subgênero *Nyssorhynchus* também tem importância epidemiológica na Mata Atlântica, entre eles: *An. aquasalis*, considerado vetor primário. E os mosquitos *An. strodei* e *An. evansae*, são considerados vetores auxiliares, ou seja, (espécies secundárias) <sup>84</sup>.



**Figura 2 - Vetor *Anopheles (Kerteszia) cruzii***

Autor Genilton Vieira

Fonte: De Pina Costa *et al.*<sup>12</sup>



**Figura 3- Bromélia Vriesea sp**  
Autor Genilton Vieira  
Fonte: De Pina Costa *et al.*<sup>12</sup>



### **3 A detecção de *Plasmodium* em reservatórios primatas não humanos nos estudos epidemiológicos. Métodos invasivos versus não invasivos**

A detecção de DNA no meio ambiente, *eDNA* (*enviromental DNA*- DNA ambiental), como por exemplo em amostras de fezes, urina, saliva, entre outros, tem sido um recurso valioso em trabalhos que visam o monitoramento de espécies de animais e também no sentido de mitigar, complementar ou substituir o uso de técnicas de coletas invasivas, pois evitam as situações de estresse de forma individual ou do bando, riscos de morte nos procedimentos de captura, contenção e anestesia, ou seja, proporciona bons resultados, pois, além de contornar a legislação ambiental, incentiva as práticas de bem-estar animal <sup>43, 44, 45</sup>.

Os estudos de malária símia se basearam nos últimos anos na detecção de plasmódios em amostras de sangue, por meio de processo invasivo e muitas vezes danoso aos animais, geralmente causando ferimentos ou até morte durante a captura, contenção e/ou anestesia. Portanto, as metodologias alternativas não invasivas, conforme referido acima, têm permitido o rastreamento mais seguro e eficaz do DNA de parasitos <sup>45-52</sup>.

Na África Central e Sudeste da Ásia, foram realizados estudos da malária por meio da análise do DNA em fezes humanas e de símios que possibilitaram a detecção de *Plasmodium spp* (eDNA), confirmando que esse método foi tão eficaz quanto aquele baseado em coleta de sangue <sup>45, 49, 53, 54</sup>. No Brasil, no município de Indaial/SC, foram coletadas amostras de fezes de símios para extração do DNA de plasmódios que corroborou os resultados dos trabalhos citados anteriormente <sup>55</sup>.

Siregar *et al.*<sup>49</sup> analisaram infecções em macacos do gênero *Macaca* no Sudeste da Ásia, no qual foram possíveis a identificação e a quantificação de parasitos (*cyt b*). Os autores também levantaram hipóteses para explicar a presença de DNA de plasmódios nas fezes de símios: 1 - pela passagem de DNA livre de parasitos degradados no fígado que caem nas fezes por meio da bile ou 2- via soro, dentro de fagossomos de macrófagos no sistema reticuloendotelial do hospedeiro.

Abkallo *et al.*<sup>56</sup> conduziram um estudo experimental em roedor, realizado a partir da inoculação de esporozoítos de *Plasmodium berghei* e conseguiram detectar DNA desse plasmódio no fígado, na bile e nas fezes, comprovando assim a possibilidade de rastreamento do parasito pela via biliar.

Contudo vale ressaltar que é preciso realizar estudos que demonstrem o trajeto realizado pelos plasmódios albergados no intestino de símios, visto que possivelmente estão associados às formas parasitárias sanguíneas ou àquelas oriundas do fígado.

#### 4 Bugio-Ruivo, *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) e seu papel como reservatório de plasmódios.

Conhecido também como bugio, guariba, roncador, macaco-uivador, entre outros, esse primata neotropical do gênero *Alouatta*, pode ser encontrado em matas primárias, secundárias e também em fragmentos de matas alterados pela ação antrópica em uma área geográfica que se estende do México até a Argentina <sup>57, 58, 59</sup>.

Na Mata Atlântica ocorre o endemismo da subespécie *Alouatta guariba clamitans*, o bugio ruivo, (figura 04), atualmente essa subespécie está classificada como ameaçada de extinção, devido à fragmentação e perda de habitat, caça, comércio de animais de estimação, morte pelo vírus da febre amarela, bem como por morte ocasionada por pessoas mal informadas, que acreditam que o macaco é o principal transmissor da referida arbovirose.

Na cadeia epidemiológica o bugio é um amplificador, pois no período de viremia pode infectar vários mosquitos, assim como qualquer outro primata, incluindo o ser humano <sup>59, 60, 61</sup>, a espécie *Alouatta guariba clamitans* atualmente está em declínio populacional.



**Figura 4- Distribuição geográfica da espécie *Alouatta guariba clamitans***

Fonte: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources - iucnredlist <sup>61</sup>

A maioria dos primatas não humanos do Novo Mundo é suscetível ao vírus da febre amarela, principalmente, do gênero *Alouatta* <sup>64</sup>.

No surto de febre amarela que ocorreu no Rio Grande do Sul, entre 2008 e 2009, foram registradas as mortes de mais de 2 mil primatas não humanos (PNH), principalmente de

bugios. E esse número pode ser ainda maior, dado que muitos animais morreram dentro das matas, não sendo encontrados por conta da deterioração do corpo e do difícil acesso às áreas restritas. Nos estados do Espírito Santo e São Paulo, estima-se a morte de 1,3 mil e 5 mil bugios no ano de 2017, respectivamente <sup>60, 62, 63</sup>.

Uma das possíveis explicações para a suscetibilidade do bugio ao vírus amarelo, é que esse macaco habita a copa das árvores e é diurno, comportamento semelhante ao do mosquito *Haemagogus leucocelaenus*, um dos vetores da febre amarela silvestre <sup>60</sup>.

Situação semelhante ao mosquito *Anopheles (Kerteszia) cruzii* que apresenta o comportamento acrodendrófilo, ou seja, circula na copa das árvores, porém Deane observou a dispersão vertical nessa espécie, ou seja, a capacidade de realizar o repasto sanguíneo tanto no nível do solo quanto no nível da copa, com isso foi possível definir que essa espécie é a vetora responsável pela transmissão da malária humana e símia nas áreas de Mata Atlântica <sup>24,42</sup>.

Como o vírus da febre amarela circula dentro das florestas, muitos macacos ainda poderão morrer, porém, cerca de 20% poderá adquirir anticorpos contra o vírus e assim obter imunidade permanente <sup>60, 62</sup>.

No que diz respeito ao dimorfismo sexual de bugios, há uma diferença de peso corporal entre macho e fêmea que pode variar até 2 quilos, sendo que o macho adulto é mais pesado, registrando de 5 a 9 Kg. Outra diferença é que o macho possui o osso hióide maior que o das fêmeas, sendo esta estrutura responsável pela ressonância do ronco (vocalização) característico dessa espécie de símio. O macho também apresenta uma barba proeminente e a coloração dos pelos avermelhados, enquanto nas fêmeas, são amarronzados (Figuras 05 e 06) <sup>57, 59</sup>.



**Figura 5- Bugio macho, PEC - Núcleo Pedra Grande – SP**  
Autora: Thais de Moura Coletti, 2016



**Figura 6 -Bugio fêmea, PEC - Núcleo Pedra Grande - SP**  
Autora: Thais de Moura Coletti, 2016

Quanto à dieta do Bugio-ruivo, esta é classificada como folívoro-frugívora, sendo que esta composição representa cerca de 79% da alimentação, que ocasionalmente pode conter caules, cascas, flores e líquens, por esse motivo ele é considerado um dispersor primário de sementes, capaz de regenerar matas e contribuir para a vida de espécies vegetais e também animais, como o besouro da subfamília Scarabaeinae<sup>57, 59, 65, 66</sup>.

#### **4.1 A relação entre os macacos e os besouros coprófagos**

##### **4.1.1 Recursos alimentares dos besouros Scarabaeidae**

Há cerca de 2.500 gêneros e 35.000 espécies descritas de besouros da superfamília Scarabaeoidea no mundo. Algumas espécies são micetófagas, detritívoras, coprófagas ou necrófagas. Podem preda formigas do gênero *Atta* e diplópodes e ainda podem se alimentar de pólen, mel, flores e frutos em decomposição. A maior família do grupo é Scarabaeidae que inclui cerca de 1.600 gêneros e 27.000 espécies<sup>67-70</sup>.

A subfamília Scarabaeinae, pertence à família Scarabaeidae e contém cerca de 257 gêneros e 6 mil espécies, sendo encontrada em todos os continentes, com exceção da Antártida. No Brasil, um estudo constatou a presença de 618 espécies descritas de Scarabaeinae, embora o trabalho indique que apenas metade da diversidade real destes

besouros é conhecida. No estado de São Paulo foram registradas 192 espécies dessa subfamília, sendo considerado o estado brasileiro com maior diversidade de espécies <sup>71</sup>.

Os escarabeíneos utilizam fezes, frutas e carcaças apodrecidas, como alimento. Alguns são especializados no consumo de fezes de pequenos mamíferos que habitam florestas tropicais, possivelmente pela maior disponibilidade do recurso, o que também exigiria menos esforço de voo. Algumas espécies de besouros como aquelas dos gêneros *Uroxys* e *Trichillum* se especializaram em realizar foresia em preguiças do gênero *Bradypus*, já que as mesmas demoram quase uma semana para defecar, além disso, saem do dossel para enterrar as fezes. Esse comportamento do bicho preguiça diminui a exposição do mesmo contra possíveis predadores <sup>67, 72, 74</sup>.

Alguns besouros alimentam-se especificamente de fezes (coprófagos) e costumam transportar e enterrar parte do recurso para diferentes localidades, o que contribui de forma secundária para a dispersão de sementes. Esse comportamento faz com que alterações físico-químicas ocorram no solo, colaborando com a ciclagem do nitrogênio e de outros nutrientes, promovendo o desenvolvimento das plantas e, além disso contribuindo indiretamente com o controle biológico de ovos e larvas de dípteros pragas e também com o controle de nematoides e outros parasitas, porém em locais com falta de saneamento básico podem contribuir com a dispersão desses parasitas <sup>73, 75, 76, 77</sup>.

Fezes de macacos são consideradas um recurso alimentar importante para os besouros da subfamília Scarabaeinae nas florestas tropicais, mas pouco se sabe sobre uma possível especialização na dieta desses coleópteros. Estudo conduzido por Noriega <sup>78</sup>, no Parque Nacional Natural Sierra de La Macarena, na Amazônia colombiana, foi sugerida uma possível preferência de algumas espécies de besouros, entre eles *Canthon* do subgênero (*Glaphyrocanthon*) e o besouro *Onthophagus haematopus*, por fezes de *Alouatta seniculus* (bugios) e de *Lagothrix lagotricha* (macacos barrigudos).

Estrada *et al.* <sup>79</sup>, realizaram pesquisa na estação biológica de Los Tuxtlas, México, que demonstrou a preferência dos besouros *Canthon* (*Glaphyrocanthon*) *femoralis*, *Eurysternus mexicanus*, *Dichotomius satanas*, *Canthon sp* e *Copris laeviceps* por fezes de *Alouatta palliata*, enquanto, na estação Los Amigos do campo no departamento de Madre de Dios na Província de Manu, Peru, foi observado que há especialização de uma espécie de besouro *Canthon* (*Glaphyrocanthon*) *aff. quadriguttatus* por fezes do macaco-da-amazônia, *Callicebus brunneus* e por fezes do macaco saki de cara calva, *Pithecia irrorata irrorata* <sup>80</sup>.

## 5 Alguns aspectos da biologia de Scarabaeinae

No antigo Egito, o comportamento de nidificação de escaravelhos da espécie *Scarabeus sacer*, impressionou muito o povo daquela região, pois esse besouro reuniu três elementos de muita importância para a mitologia: o solo, o sol e o gado. Os egípcios faziam uma alusão do movimento do besouro rolando a esfera de esterco ao sol se movimentando no céu. Além disso, os egípcios relacionavam o ciclo de vida do besouro (ovo, larva, pupa e o adulto alado) à ressurreição e, portanto, os associava à simbologia das múmias e das pirâmides<sup>67</sup>.

Geralmente os ovos dos Scarabaeinae são depositados em substrato composto por esterco ou outro material orgânico. Algumas espécies de besouros podem usar uma variedade menor de esterco, ficando próximos ao habitat de algum mamífero. Durante a oviposição, as fêmeas defecam no material orgânico, onde o ninho está sendo preparado para quando a larva eclodir, se alimentar das fezes e da microbiota presente na mesma, facilitando futuramente a sua digestão. A larva também pode se alimentar das próprias fezes, enriquecendo sua microbiota intestinal. No final do desenvolvimento, a larva constrói uma câmara de pupação, na qual a forma adulta se completará. Aproximadamente o tempo de desenvolvimento entre ovo a adulto pode variar de 30 a 50 dias<sup>67, 68, 73</sup>.

A emergência do besouro adulto tem relação com a umidade e temperatura do ambiente e, um tempo depois que a muda ocorre (sendo que o adulto emerge e deixa a cutícula da pupa para trás) o besouro deixa a câmara pupal e começa a se alimentar por algumas semanas e até mesmo alguns meses, sendo esse intervalo de tempo chamado de período da maturação. Logo após esse período, ocorre o acasalamento, no qual macho e fêmea são atraídos por feromônios voláteis de curta distância.<sup>67, 68, 73</sup>

Nos besouros coprófagos existem muitas modificações morfológicas, na larva o desenvolvimento pode ser influenciado pela adaptação trófica, sendo uma fase mais curta do que em besouros de outros hábitos alimentares, provavelmente pela condição precária do recurso alimentar. A larva também possui um aparelho bucal muito diferente do adulto, sendo descrito como forte e com a função de esmagar ou cortar pedaços grosseiros<sup>73</sup>.

Já o besouro adulto possui aparelho bucal especializado em alimento macio ou pastoso e restrito a ingestão de partículas muito pequenas. Para ingerir as fezes os besouros lambem com o auxílio do maxilar que é repleto de pelos, posteriormente ocorre a filtração das fezes por cerdas presentes no aparelho bucal, as partículas maiores são rejeitadas e as partículas

finas são concentradas e passam por um filtro, com possível participação da epifaringe, finalizando na ingestão. Nessa fase o besouro se alimenta mais (período de maturação), para desenvolver por completo as gônadas e ovos, diferente de outros insetos que se alimentam mais na fase imatura. A visão é pouco desenvolvida, porém a longevidade é maior, o olfato é bem desenvolvido por causa das antenas quimiorreceptoras. Também são desenvolvidas: a percepção tátil e a percepção da temperatura ambiente <sup>73,109</sup>.

Entre as características morfológicas principais da larva estão o seu formato escarabeiforme curvadas em formato da letra C e quando em vida livre a larva mais precisamente tem o formato da letra S, a coloração é amarelada ou esbranquiçada. <sup>68,73</sup>.

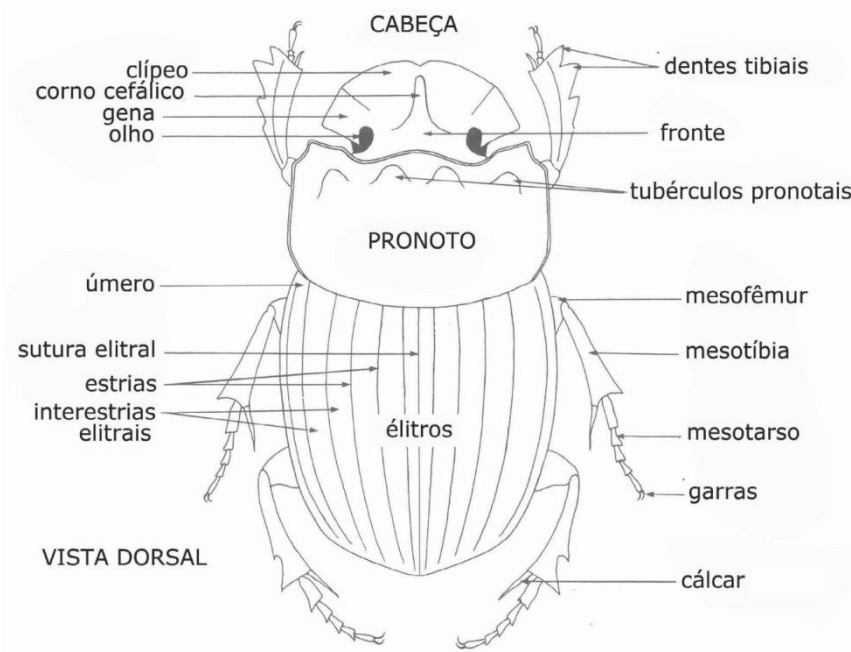
Já os besouros adultos possuem antenas lameladas, clavas antenais com três lamelas, clipeo cobrindo a mandíbula e o labro, pigídio exposto, em geral vertical em relação ao eixo longitudinal do corpo, porém pode ser também ventral, e por fim, tíbias posteriores com único esporão apical (Figuras 07 e 08) <sup>86</sup>.

A coloração desses besouros pode variar de preta opaca até cores metálicas e aposemáticas. O tamanho desses escaravelhos pode variar muito de acordo com a espécie, alguns com poucos milímetros até mais de 5 centímetros. O formato do corpo normalmente é oval, porém alguns gêneros podem ter o corpo retangular. O dimorfismo sexual ocorre em algumas espécies, sendo que o macho pode apresentar um corno robusto que a fêmea geralmente não possui <sup>86</sup>.

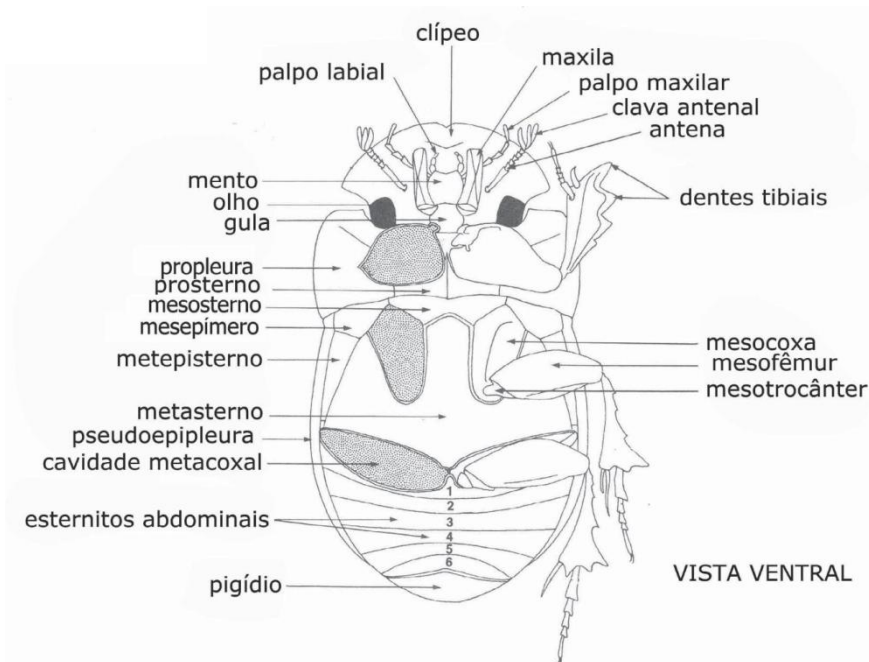
Esses besouros são conhecidos também pelo nome popular de “rola-bostas”, pois algumas espécies fazem uma esfera com esterco, carcaça ou fruta em processo de decomposição, objetivando o deslocamento do recurso (telecoprismo), enquanto outros besouros constroem um túnel abaixo das fezes, onde levam o alimento (paracoprismo) (Figura 9) ou ainda, outras espécies podem construir seus ninhos dentro dos alimentos ou fezes (endocoprídeos) <sup>73</sup>.

Na América do Sul alguns Scarabaeinae são considerados coprófagos, entre eles: *Glaphyrocantion*, *Dichotomius*, *Ateuchus* e a maioria das espécies de *Onthophagus* <sup>73</sup>.





**Figura 7- Características morfológicas dorsais de um besouro Scarabaeinae**  
 Fonte: Vaz-de-Mello *et al.*<sup>86</sup>



**Figura 8- Características morfológicas ventrais de um besouro Scarabaeinae**  
 Fonte: Vaz-de-Mello *et al.*<sup>86</sup>



**Figura 9 - Besouro com comportamento de paracoprismo no IBot, São Paulo**  
Autora: Fabiana Santos Silva, 2019

## 6 JUSTIFICATIVA

As matas da Serra da Cantareira até meados de 1960 eram preservadas e habitadas por grande população de bugios e também do vetor *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, fato que possibilitou que o Prof. Deane realizasse importantes estudos entomológicos localmente, publicando inclusive a descrição do primeiro caso de infecção natural em humanos por *Plasmodium simium*, que ocorreu em uma situação zoonótica, na qual o guarda florestal que o auxiliava nos trabalhos de coleta de anofelinos nas copas das árvores, contraiu o *P. simium* que circulava entre os bugios <sup>27, 28, 42</sup>.

Posteriormente, dois estudos demonstraram que *P. simium* e *P. brasilianum* ainda circulavam entre os bugios da Serra da Cantareira. Essas pesquisas utilizaram a técnica de PCR e permitiram a detecção de DNA de *P. simium* e *P. brasilianum* em amostras de sangue de macacos resgatados na Grande São Paulo <sup>18, 19, 40</sup>.

A escassez de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* evidenciada em estudo entomológico, suscitou indagações a respeito da manutenção do ciclo de transmissão da malária símia entre os bugios da Serra da Cantareira <sup>81</sup>.

Com o propósito de elucidar essas indagações, foi realizada pesquisa, a fim de verificar o status da transmissão dos plasmódios símios em áreas de Mata Atlântica nas zonas norte e sul do município de São Paulo. Os resultados entomológicos indicaram a baixa frequência de anofelinos em especial fêmeas de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* no Parque Estadual da Cantareira (PEC), contudo mesmo dentre os poucos exemplares analisados foi possível identificar a infecção natural por *P. simium*, por meio de PCR. Neste mesmo estudo, foi possível detectar a presença de DNA de *P. simium* em amostras de fezes de bugios do PEC por meio de uma abordagem não invasiva, baseada no diagnóstico de DNA ambiental (Projeto FAPESP 2014/10.919-4, coordenado pela Dra. Ana Maria Duarte/SUCEN em parceria com IMT/USP, dados não publicados).

Durante a realização das coletas de fezes de bugios dentro das atividades do projeto supracitado, foi observada a presença de besouros coprófagos, o que motivou a realização do presente estudo sobre a possível relação entre os bugios e os besouros, considerando a hipótese de que o besouro coprófago poderia apresentar nas fezes presentes em seu conteúdo intestinal, rastros de DNA de símios e/ou de plasmódios.

Contudo, em outubro de 2017 teve início a epizootia de febre amarela na cidade de São Paulo que teve continuidade em 2018 e infelizmente dizimou todas as famílias de bugios

que habitavam os Parques Estaduais da Cantareira (PEC) e Alberto Löfgren (PEAL), inviabilizando a continuidade do estudo nessas áreas.

Porém, após avaliação de que o número de coletas de fezes de bugios e de besouros no PEC e PEAL foram suficientes, optou-se por dar continuidade ao estudo, incluindo o Instituto de Botânica de São Paulo (IBot) que faz parte do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), uma vez que pesquisa realizada localmente, demonstrou a presença de plasmódio em sangue de bugios que circulam nessa área <sup>19</sup>.

Assim sendo, este estudo objetiva avaliar a presença do DNA de plasmódios e de bugios nas amostras de fezes e no conteúdo intestinal dos besouros coprófagos das zonas norte (PEC e PEAL) e sul (IBot, /PEFI) do município de São Paulo, bem como avaliar a possível presença de sangue nas amostras de fezes de bugios com o intuito de inferir sobre a origem do DNA do plasmódio.

## 7 OBJETIVOS GERAIS

Detectar os plasmódios símios nos bugios do Parque Estadual da Cantareira (PEC), Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL) e do Instituto de Botânica de São Paulo (IBot), por meio de nova abordagem de rastreamento de DNA ambiental (eDNA) em fezes dos bugios e no conteúdo intestinal de besouros coprófagos (Scarabaeinae).

### 7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os besouros Scarabaeinae encontrados nas fezes dos bugios;
- b) Inferir sobre as espécies de besouros que estão associadas a fezes de bugios no PEC, no PEAL e no IBot;
- c) Detectar a presença do DNA de bugio nas fezes coletadas por meio da técnica de (PCR) convencional;
- d) Detectar a infecção natural por *Plasmodium* spp nas fezes coletadas de bugios (eDNA) por meio da técnica (PCR) convencional e em tempo real;
- e) Detectar a presença do DNA de bugios no conteúdo intestinal do besouro Scarabaeinae por meio da técnica (PCR) convencional;
- f) Detectar a presença do DNA de *Plasmodium* spp no conteúdo intestinal do besouro Scarabaeinae por meio da técnica (PCR) convencional e em tempo real;
- g) Verificar a presença de sangue nas amostras de fezes de bugios com o intuito de inferir sobre o possível trajeto percorrido pelos plasmódios no organismo dos bugios até sua chegada às fezes.

## 8 MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1 Áreas de Estudo

#### 8.1.1 Serra da Cantareira

Os locais escolhidos para o estudo foram o Parque Estadual da Cantareira (PEC) que possui 79,2 km<sup>2</sup> e está localizado à 23° 24' 5" S e 46° 35' 24" O e o Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL), que possui 1,7 km<sup>2</sup> e localiza-se à 23° 27' 33" S e 46° 38' 02" ambos contíguos e situados na zona norte do município de São Paulo (figura 10)<sup>95,107</sup>.

Tais áreas foram escolhidas para o estudo justamente por apresentarem à época uma grande população de *Alouatta guariba clamitans* (bugios) e no passado, terem sido alvo de estudo da malária símia pelo Dr. Leônidas Deane.

A população estimada de bugios na Serra da Cantareira era de aproximadamente 4500 indivíduos até o período que antecedeu a epizootia de febre amarela ocorrida no final de 2017<sup>82</sup>.

Os pontos escolhidos para a realização das coletas de fezes e besouros coprófagos foram definidos pela identificação de grupos de bugios e de suas áreas de alimentação e dormitório, (visto que estas áreas geralmente coincidem com a presença de fezes no solo), assim como por características paisagísticas, tais como: florestas maduras ou secundárias, presença de bromélias (ambientes com maior chance de ocorrência de anofelinos) e ambientes degradados.

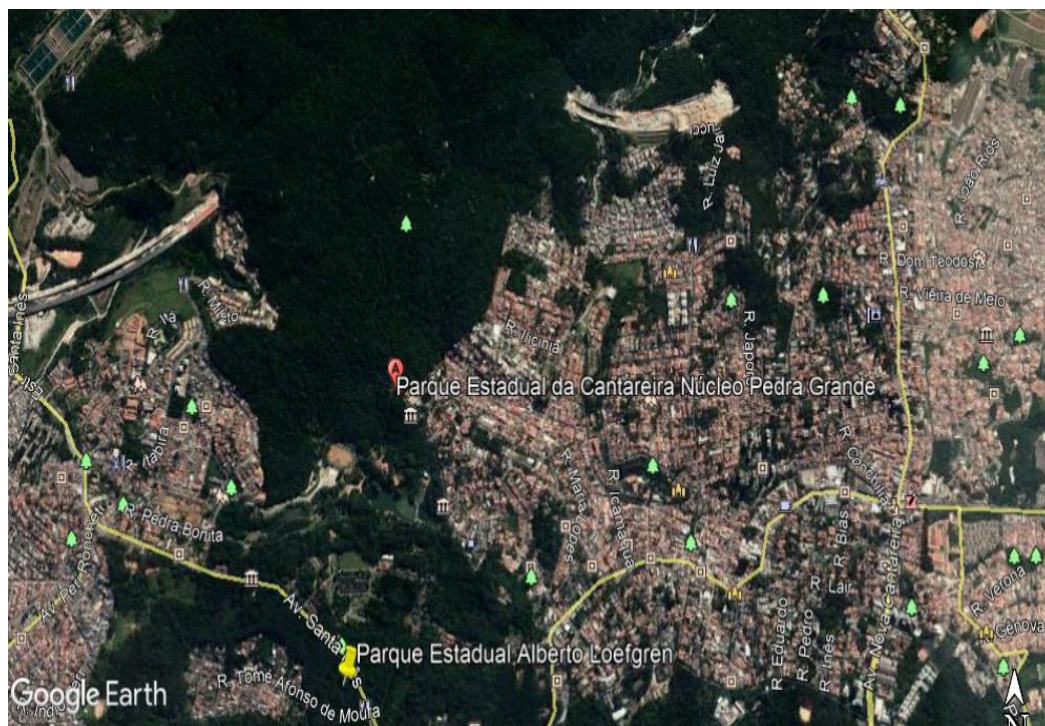
#### **Os pontos de coleta definidos no Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL) foram:**

- Instituto Florestal – Trilha da Dasonomia
- Horto Florestal - Trilha Palácio do Governador

Esses dois pontos apresentam áreas mais degradadas sob o aspecto paisagístico (mata secundária - entremeios e entorno).

#### **Os pontos de coleta definidos no Parque Estadual da Cantareira (PEC) foram:**

- Núcleo Pedra Grande: alguns pontos definidos dentro desse Núcleo (área mais preservada sob o aspecto paisagístico (mata primária).
- A área intermediária ficou definida pela proximidade entre a área preservada e área degradada, fazendo fronteira entre elas.



**Figura 10- Imagem do PEC e PEAL**

Fonte: Google Earth<sup>105</sup>

As coletas no PEC e no PEAL foram realizadas entre dezembro de 2016 e dezembro de 2017, perfazendo um total de 15 coletas (alguns meses com 2 coletas).

O início das atividades de coleta das fezes dos bugios e dos besouros no PEAL e no PEC foram realizadas com o apoio do Pesquisador Científico Marcio Port Carvalho da Seção de Animais Silvestres do Instituto Florestal da Secretaria de Estado do Meio Ambiente/SP que nos orientou na definição das áreas de coleta. Para tanto, os critérios utilizados para a localização dos grupos de bugios foram a busca de árvores dormitório (“*sleeping site*”) e de locais de preferência para sua alimentação (palmeira jerivá, figueira, entre outros), visto que esses locais aumentam a chance de encontro de fezes desses primatas.

## 8.2 Instituto de Botânica de São Paulo (IBot)

O local escolhido para o estudo foi o Instituto de Botânica de São Paulo (IBot), que possui 360 mil metros quadrados e está localizado à 23° 38' 30.7'' S e 46° 37' 14.2''), situado na zona sul do município de São Paulo (figura 11) <sup>108</sup>.

O IBot pertence ao Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), sendo um remanescente de Mata Atlântica que apresenta uma população de bugios estimada em 200 indivíduos (Informações obtidas do relatório de Clerici <sup>83</sup>, dados não publicados).

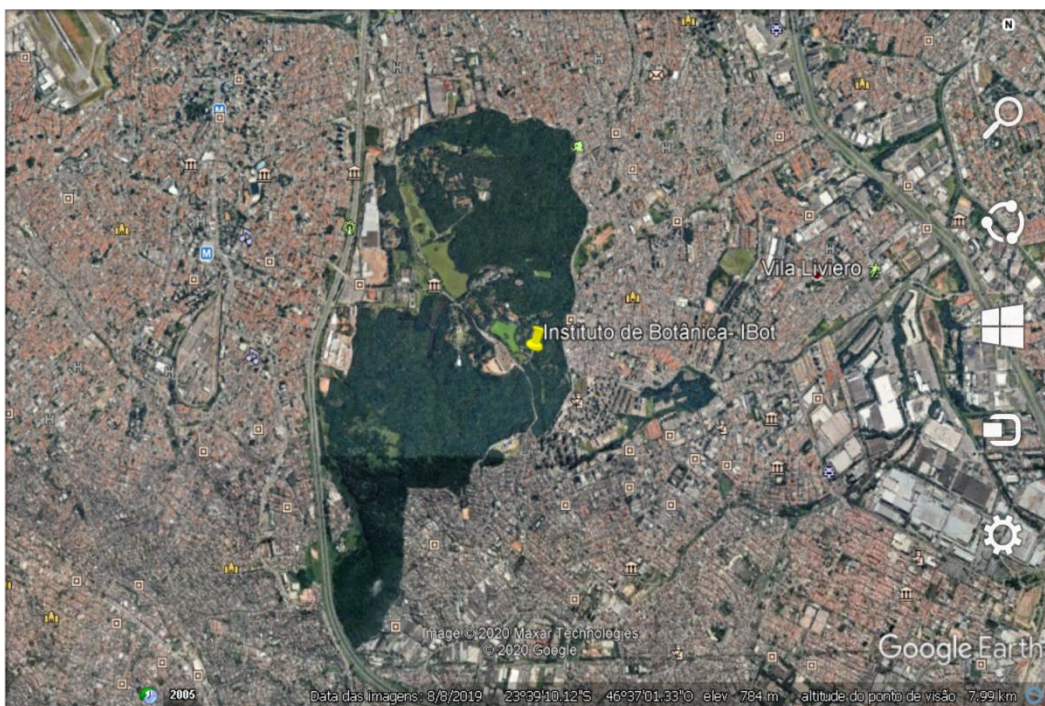
Não há registro sobre a presença de *Anopheles* do subgênero *Kerteszia* nessa área, porém foram encontrados *Anopheles* (*Nys.*) *strodei* em coleta entomológica realizada por Chagas *et al.* <sup>93</sup> no Parque Zoológico de São Paulo, situado também dentro do PEFI. Essa espécie de anofelino possui importância epidemiológica, pois se trata de um vetor zoofílico, porém com competência para transmitir plasmódios <sup>1,84</sup>.

Estudo realizado por Yamasaki *et al.* <sup>19</sup>, demonstrou a circulação de plasmódios símios nessa área através da análise de amostras de sangue de bugios provenientes do IBot.

Os pontos de coleta definidos no Instituto de Botânica (IBot) foram:

- Trilha Marginal 1 (direita)
- Trilha Marginal 2 (esquerda)
- Trilha da Nascente (Suspensa)
- Trilha divisa zoológico





**Figura 11 - Imagem do Instituto de Botânica- IBot**

Fonte: Google Earth <sup>106</sup>

As coletas no IBot foram realizadas de agosto de 2018 a junho de 2019, perfazendo um total de 11 coletas.

O início das atividades de coleta das fezes dos bugios e dos besouros no IBot foram realizadas com o apoio do Pesquisador Científico Eduardo Pereira Cabral Gomes do Instituto de Botânica da Secretaria Estadual do Meio Ambiente/SP, que nos orientou a procurar pelos bugios em áreas próximas às bordas de mata com a presença da *Alchornea sidifolia* (Tapiá-guaçu, árvore típica da Mata Atlântica), pois suas folhagens são bastante utilizadas na alimentação desses símios, além das figueiras e dos jerivás (comunicação pessoal).

### **8.3 Coletas das fezes dos bugios e dos besouros coprófagos no PEC, PEAL e IBot**

A coleta do material foi feita diretamente das fezes caídas no solo (terra ou asfalto) em cada ponto previamente definido (figuras 12 e 13) dos quais obtivemos a coordenada geográfica marcada pelo GPS Garmin, mod. Etrex.

Simultaneamente foi realizada a coleta dos besouros que estavam sobre ou no interior das amostras de fezes de bugios, sendo que foi atribuído o mesmo número colocado nas amostras das fezes de bugios às amostras de besouros (ambas acondicionadas em tubos

Falcon<sup>®</sup> estéreis), acrescido do número de besouros coletados/amostra de fezes. Os besouros foram sacrificados por submersão em álcool 70%.

Para a coletas das fezes de bugios, foram utilizados coletores estéreis específicos para fezes (tubos coletores com espátula, Sarsdest, ref. 80.734.311). Imediatamente após a coleta, foi acrescido **RNA later** (Qiagen), na proporção 1:1 (conservar/estabilizar DNA e RNA) ou álcool 70% (1:1), que pode ser usado em substituição aos tubos com espátula (Siregar et al., 2015). As amostras de fezes foram encaminhadas ao Laboratório de Protozoologia do IMT/USP e mantidas em freezer -20° C até a realização da extração de DNA.

Os dados das amostras foram anotados em uma planilha no campo, com as seguintes informações: número da amostra de fezes, data, local, ponto específico, coordenadas geográficas, frescor das fezes, coloração, presença de fibras e sementes, presença de besouros e conservante utilizado. As informações foram agregadas em um banco de dados no programa EXCEL.



**Figura 12- Coleta de fezes de Bugio no PEC - Núcleo Pedra Grande**

Autora: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, 2016



**Figura 13- Fezes de bugio caídas no solo - Instituto de Botânica - IBot - SP**  
Autora: Fabiana Santos Silva, 2019

#### **8.4 Dissecção e identificação do conteúdo intestinal do besouro coprófago e identificação taxonômica**

A dissecção dos besouros foi realizada de acordo com metodologia descrita por Gómez *et al.*<sup>85</sup>, com pequenas modificações.

No laboratório de Protozoologia do IMT- USP, cada besouro foi retirado do tubo com álcool 70% e lavado com água destilada quente por 2 minutos para remoção de fezes e terra. A água quente também auxiliou no processo de amolecimento do tegumento, facilitando o corte por alfinetes nos esternitos abdominais. Em uma Placa de Petri cada exemplar foi disposto e dissecado com auxílio de alfinetes entomológicos de inox (n.1 ou 2) e pinça entomológica. A dissecção foi feita com auxílio de Lupa Estereoscópica, LEICA, modelo LED2500.

Após a dissecção, cada intestino com o conteúdo fecal foi armazenado em um tubo de 1,5 ml com 300 µl de *RNAlater* (Qiagen) ou álcool 70% para posterior extração de DNA.

Os instrumentos utilizados na dissecção de cada besouro foram esterilizados com álcool 70% e posteriormente deixados em luz UV por 10 minutos, evitando assim a contaminação entre os indivíduos dissecados.

Após a dissecção dos besouros, estes foram colados, montados com etiquetas e alfinetes entomológicos, inclusive com as genitálias masculinas dissecadas e coladas em

anexo no alfinete correspondente, a fim de serem posteriormente, identificados no laboratório de Coleópteros do Museu de Zoologia da USP (MZUSP), com supervisão do Dr. Juarez Fuhrmann e da Profa. Dra. Sônia Aparecida Casari.

Para a identificação dos besouros ao nível de gênero e espécie, foi utilizada chave taxonômica pictórica <sup>86</sup> (Figura 14).

Para a confirmação de eventuais dúvidas em relação à identificação taxonômica dos besouros, os exemplares foram encaminhados ao Prof. Dr. Fernando Zagury Vaz-de-Mello da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), confirmando a identificação.

Os espécimes foram doados ao Acervo do Museu de Zoologia da USP (MZUSP).



**Figura 14 - Identificação taxonômica dos besouros no Museu de Zoologia da USP**  
Autora: Thaís de Moura Coletti

## 8.5 Extração de DNA das amostras de fezes de bugios

A extração de DNA foi feita por meio do “QIAamp Stool kit” (Qiagen), com pequenas modificações propostas por Siregar *et al.* <sup>49</sup>. As amostras foram lisadas com tampão ASL, “overnight”, em agitação intermitente para aumentar a concentração de DNA. As demais etapas seguiram o protocolo original do fabricante. Foram utilizadas ponteiras estéreis e com filtro durante todo o processo para evitar contaminações.

## 8.6 Extração de DNA do conteúdo intestinal dos besouros coprófagos

A extração de DNA de cada amostra de intestino dos besouros foi realizada por meio do DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), segundo o protocolo original do fabricante.

## 8.7 PCR para detecção do DNA de *Alouatta* nas fezes dos bugios (*Alouatta guariba clamitans*) e do conteúdo intestinal dos besouros Scarabaeidae

O par de *primers* e o protocolo da reação para a amplificação de fragmento de Citocromo b (*cyt b*) do gênero *Alouatta* foram elaborados pela Dra. Licia Natal Fernandes do Laboratório de Protozoologia do IMT/USP (dados não publicados).

### Sequência dos *Primers*:

PF ALBr: 5'TCAACTGCYTTCTCC TCA GTCGC 3' PR ALBr: 5'GGTCGG  
TTAGAAGGTCAG GTG 3'

### 8.7.1 Descrição da Reação

Para a realização da reação de amplificação foram utilizados 5,0 µl de DNA, 13,8 µl de água, 1,5 µl de cloreto, 0,5 µl de DNTP, *primer* PF Al Br 0,75 µl, *primer* PR Al Br 0,75 µl e Taq 0,2 µl, sendo usados os parâmetros de desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de

35 ciclos a 94°C por 30 s, 35 ciclos a 60°C por 30 s, 72°C por 1 min e extensão final de 72 °C por 10 min no equipamento *Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems)* no Laboratório de Protozoologia, IMT/USP.

O produto amplificado foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% em Solução de TBE, sendo que a reação produz um fragmento de 580 pares de bases (pb).

Foram incluídos controles positivo e negativo em todas as reações.

## **8.8 PCR em Tempo Real (TaqMan) para detecção de DNA de plasmódios nas amostras de fezes de Bugios (*Alouatta guariba clamitans*) e no conteúdo intestinal dos besouros Scarabaeidae**

A PCR em tempo real (TaqMan) foi utilizada para amplificar o fragmento de 100 pb do gene 18S rRNA de *Plasmodium* com *primers* e sondas específicos para gênero e espécies (*P. vivax* e *P. malariae*), de acordo com protocolo descrito por Bickersmith *et al.*<sup>87</sup>.

### **8.8.1 Descrição da Reação**

As reações foram realizadas separadamente com cada par de *primers* e sondas correspondentes ao gênero e espécies do plasmódio. As mesmas condições foram utilizadas para a detecção de *P. malariae*, porém os *primers* e sonda foram usados como descrito por Rougemont *et al.*<sup>88</sup>. Foram incluídos controles positivo e negativo em todas as reações.

Para a reação de amplificação foram usados 2,0 µl de DNA e 7,5µl de TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix II, acrescidos de UNG (Applied Biosystems) (2X), sendo que para a sonda relacionada ao gênero *Plasmodium*, foram utilizados 0,15 µl (10µM) e para os *primers* **F** foram utilizados 0,45 µl (10µM) e *primer* **R** 0,45 µl (10µM). Para completar o volume de 15µl foram acrescidos 4,45 µl de água de injeção. Os parâmetros utilizados foram: desnaturação inicial a 50°C por 2 min, a 95°C por 10 min, 50 ciclos a 95°C por 15 min e 60°C por 1 min no equipamento *Step One Plus (Applied Biosystems)* no Laboratório de Protozoologia, IMT/USP (Tabela 03).

**Tabela 3- Primers utilizados para amplificação de *Plasmodium* em amostras de DNA obtidas de fezes de bugio e de conteúdo intestinal de besouro coprófago em PCR em tempo real no sistema Taqman**

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'	Ref.
Plasmo2-R	AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA	1
Vivax-F	GACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTAA	1
Vivaxprobe (sonda)	NED - ATAAACTCCGAAGAGAAAA – MGBNFQ	1
Mal-F Malaprobe	CCG ACT AGG TGT TGG ATG ATA GAG TAA A	2
(sonda)	FAM - CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT –MGBNFQ	2
<b>Ref. 1<sup>87</sup>, 2<sup>88</sup></b>		

### 8.9 “Nested PCR” para detecção de identificação molecular de plasmódio nas amostras de fezes de Bugios (*Alouatta guariba clamitans*) e no conteúdo intestinal dos besouros Scarabaeidae

As amostras de fezes de bugios e de conteúdo intestinal de besouros na PCR em tempo real, foram submetidas à reação de PCR convencional para a identificação molecular de fragmento de 402 pb de citocromo b (*cyt b*) de *Plasmodium*<sup>49</sup> (Tabela 03).

#### 8.9.1 Descrição da reação

Para a primeira reação da PCR foi usado 14 µl de DNA, juntamente com o *primer* Pff3700/PfR4615 que produziu um fragmento de 915 pb, sendo que para a segunda reação, foi utilizado 2 µL de DNA, juntamente com o produto da PCR da primeira reação, acrescido do *primer* Pff 3700/PfR4102, que produziu um fragmento de 402 pb (*cyt b* 1) (tabela 4).

Foram utilizados na primeira e segunda reações os parâmetros de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, sendo a desnaturação a 94 °C por 15 segundos, alinhamento a 50 °C por 15 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos com extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para a primeira reação de amplificação foram usados 14 µl de DNA, 2,5 µl de tampão buffer, 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µl de DNTP, *Primer* Pff 1 µl, *Primer* PFr 1 µl, Taq 0,25 µl e 5 µl de água de injeção para completar o volume de 25 µl.

Para a segunda reação (*Nested*), foram usados 2 µl do produto de PCR da primeira reação, 2,5 µl de tampão buffer, 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µl de DNTP, *Primer* Pff 1 µl, *Primer* PFr 1 µl, Taq 0,25 µl e 17 µl de água de injeção para completar o volume de 25 µl. Foram incluídos controles positivo e negativo em todas as reações.

**Tabela 4- Primers utilizados para amplificação de *Plasmodium* em amostras de fezes de bugios e conteúdo intestinal de besouro coprófago em Nested PCR, Siregar *et al.* <sup>49</sup>.**

Gene	Primers	Sequência	Pares de bases	Reação
<i>cyt b 1</i>	PfF3700	TGGATGGTGTTTTAGATACATGC	915	Nest 1a
	PfR4615	GTTTGCTTGGGAGCTGTAATC		
<i>cyt b 1</i>	PfF3700	TGGATGGTGTTTTAGATACATGC	402	Nest 2a
	PfR4102	GCTGTATCATACCCTAAAG		
		<b>Nest 1a – primeira reação</b>	<b>Nest 2a – segunda reação</b>	

Os fragmentos positivos obtidos na *Nested* PCR, foram purificados por meio do reagente ExoSAP-IT (Applied Biosystems) segundo protocolo do fabricante e encaminhados, juntamente com os respectivos *primers* para a Empresa Genomic para a realização do sequenciamento.

#### **8.10 Análises das sequências de DNA de plasmódios obtidas a partir de fragmento sequenciado do gene de *cyt b* de *Plasmodium***

Para a identificação molecular das sequências de *cyt b* obtidas na *Nested* PCR, foram feitas comparações destas com as sequências disponíveis no Genbank por meio da ferramenta BLAST <sup>89</sup>, sendo que posteriormente, foram confirmadas por análise filogenética, incluindo sequências de diferentes espécies de *Plasmodium* que ocorrem no Brasil, tais como: *P.*



*falciparum*, *P. vivax/P.simium* e *P. brasilianum/P.malariae*. O *Plasmodium relictum* foi utilizado como grupo externo.

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas no Clustal W<sup>90</sup> e as análises filogenéticas geradas por máxima verossimilhança no programa RAxML, Stamatakis <sup>91</sup>, implementado na plataforma CIPRES <sup>92</sup>. A confiabilidade dos grupamentos foi analisada por meio de replicação de “*bootstrap*”, sendo considerados robustos grupamentos com valores de “*bootstrap*” maiores ou iguais a 70.

### **8.11 Teste imunocromatográfico**

As amostras de fezes de bugio foram submetidas ao teste qualitativo de sangue oculto por meio do “Kit” WAMA, REF 623040-R, método imunocromatográfico de fase sólida que utiliza uma combinação de anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana.

### **8.12 Análises Estatísticas**

Os dados foram organizados em um banco no programa Microsoft Excel. E posteriormente analisados por meio de tabelas de contingência aplicando-se o teste exato de Fisher. Este teste é mais adequado do que o Qui-quadrado de Pearson quando as frequências esperadas são menores que 5. As análises e os gráficos foram elaborados no ambiente computacional R (R core team, 2019).

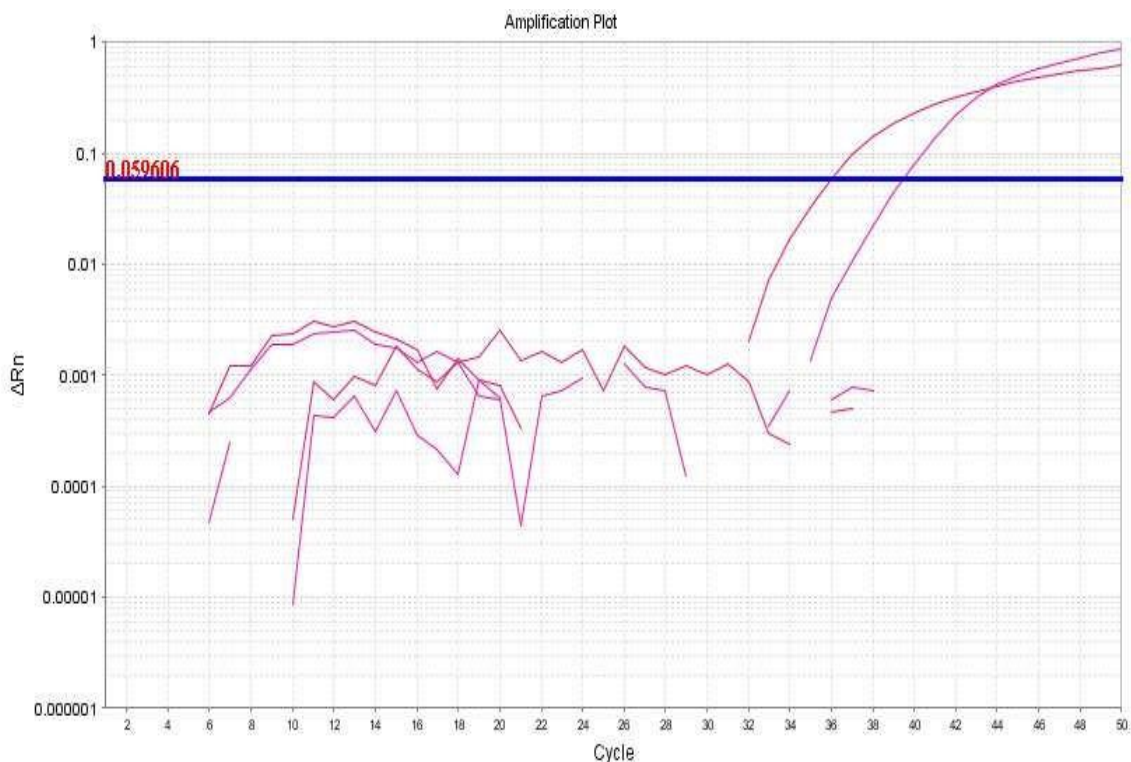
## 9 Resultados

### 9.1 Padronização dos testes moleculares

#### 9.1.1 Padronização da PCR em tempo real (TaqMan) para amplificação do fragmento 18 S rRNA de *Plasmodium*.

Amostras de DNA sabidamente positivas para *P. vivax* e *P. malariae/P. brasilianum* foram testadas com cada par de *primers* e sondas correspondentes às espécies de plasmódio citadas, segundo Bickersmith *et al.* <sup>87</sup> para amplificação do fragmento 18S rDNA de *Plasmodium* (~100pb). Foi acrescido controle negativo em cada reação (*mix* com todos os reagentes, menos a amostra de DNA).

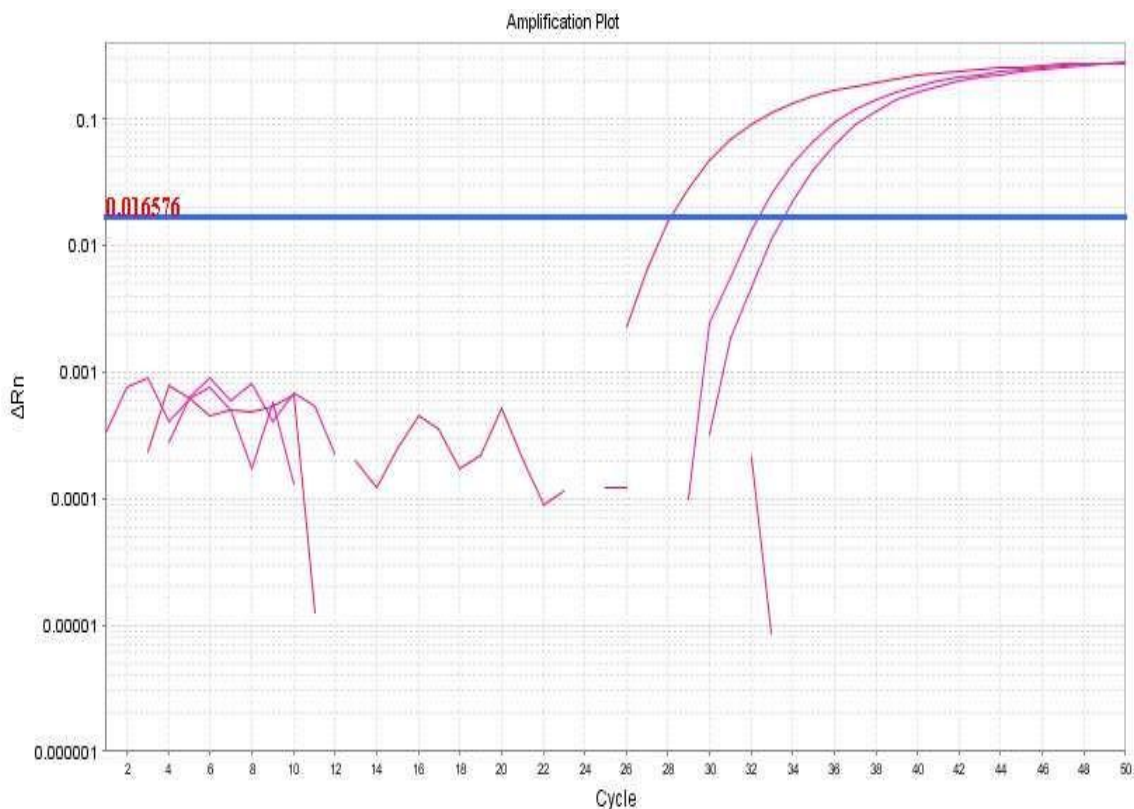
No gráfico 2, estão apresentadas as curvas de amplificação correspondentes à amostra de DNA de *Plasmodium malariae/P. brasilianum* (“pura” e diluída a 1:50 e 1:100), onde se observa o padrão positivo para a reação. A curva da amostra negativa ficou abaixo do limiar de reatividade (traço horizontal).



*cycle*: ciclos da reação     $\Delta Rn$ : quantificação da intensidade de fluorescência das amostras a cada ciclo da reação.

**Gráfico 2- Padronização da PCR em tempo real para *P. malariae*, *P. brasilianum* para amplificação de fragmento do gene 18S rRNA com primers Mal-F, Plasmo 2- R e sonda Malaprobe com amostra positiva para *P. brasilianum* (sangue de macaco *Saimiri* infectado experimentalmente com cepa Peru I T1726/2008, cedida pelo Dr. William Collins, CDC/Atlanta). As curvas de amplificação na cor rosa correspondem ao controle positivo “puro” e diluído a 1:50. O controle negativo e a diluição a 1:100 da amostra positiva ficaram abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).**

A mesma reação foi realizada com uma amostra de controle positivo para *P. vivax* obtido de paciente da região Amazônica, “pura” e diluída a 1:50 e 1:100. No gráfico 3, é possível observar as curvas de amplificação correlatas que definiram o padrão positivo para essa reação.

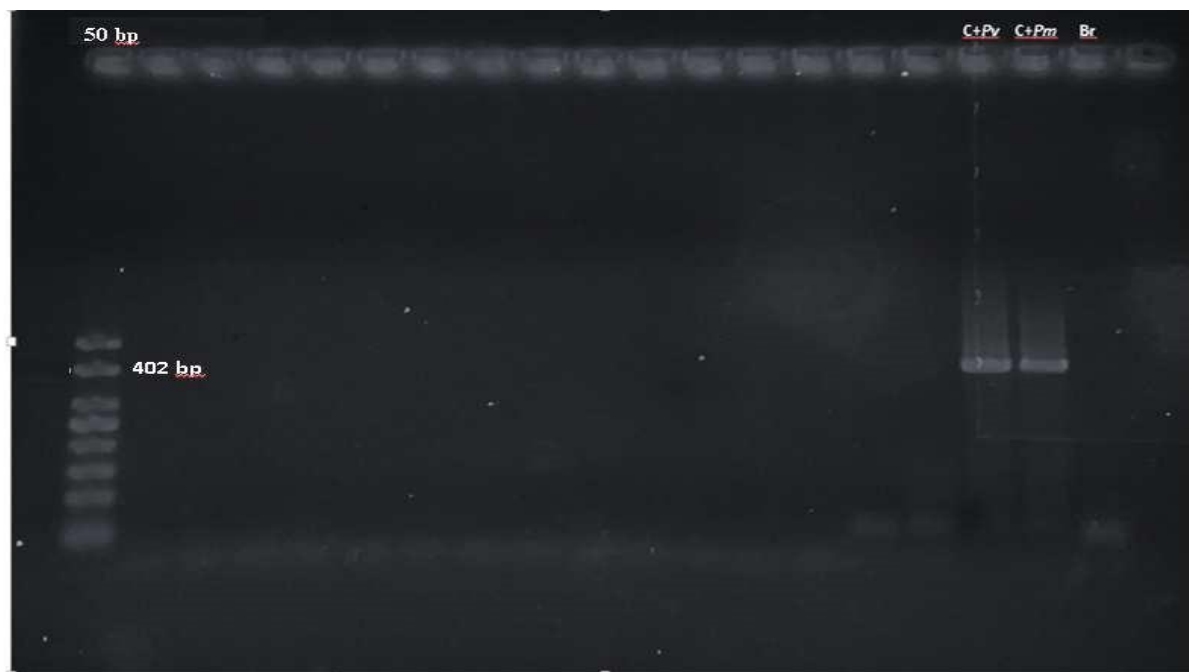


*cycle*: ciclos da reação     $\Delta Rn$ : quantificação da intensidade de fluorescência das amostras a cada ciclo da reação

**Gráfico 3- Padronização da PCR em tempo real para *Plasmodium vivax*, *Plasmodium simium* para amplificação de fragmento do gene 18S rRNA com primers Vivax-F, Plasmo 2-R e sonda Vivaxprobe com amostra positiva para *P. vivax* (sangue de paciente da região amazônica). As curvas de amplificação na cor rosa correspondem ao controle positivo puro e diluído a 1:50 e 1:100. O controle negativo ficou abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).**

## 9.2 Padronização da Reação Nested-PCR (convencional) para amplificação de fragmento de *cyt b* de *Plasmodium*

Na figura 15, são demonstrados os fragmentos amplificados com aproximadamente 402 bp dos controles positivos testados.



C<sup>+</sup>Pv: controle positivo para *P. vivax*    C<sup>+</sup>Pm: controle positivo para *P. malariae*    Br: branco

**Figura 15-** Eletroforese em gel de agarose a 2% - Nested PCR com os primers Pff3700/Pfr4615 e Pff3700/Pfr4102 para amplificação de fragmento do gene de *cyt b* de *Plasmodium* (402 bp) com DNA de controle positivo para *P. vivax* (sangue de paciente da região amazônica) e *P. brasilianum* (sangue de macaco *Saimiri* infectado experimentalmente com a cepa Peru I T1726/2008, cedido pelo Dr. William Collins, CDC/Atlanta) e controle negativo (*mix* com todos os reagentes, menos a amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 50 pares de base (bp).

## 9.3 Padronização da PCR para detecção de fragmento de *cyt b* de *Alouatta guariba clamitans* (bugio) e *Brachyteles* (Muriqui)

Amostras de DNA sabidamente positivas de sangue e de fezes de bugios foram testadas com os primers PfAlBr e PrAlBr para amplificação de fragmento específico para *cyt b* de *Alouatta*. Foram acrescentados controles negativos (*mix* com todos os reagentes, menos a amostra de DNA).

Na figura 16, podem ser observados os fragmentos amplificados com aproximadamente 580 bp das amostras positivas.

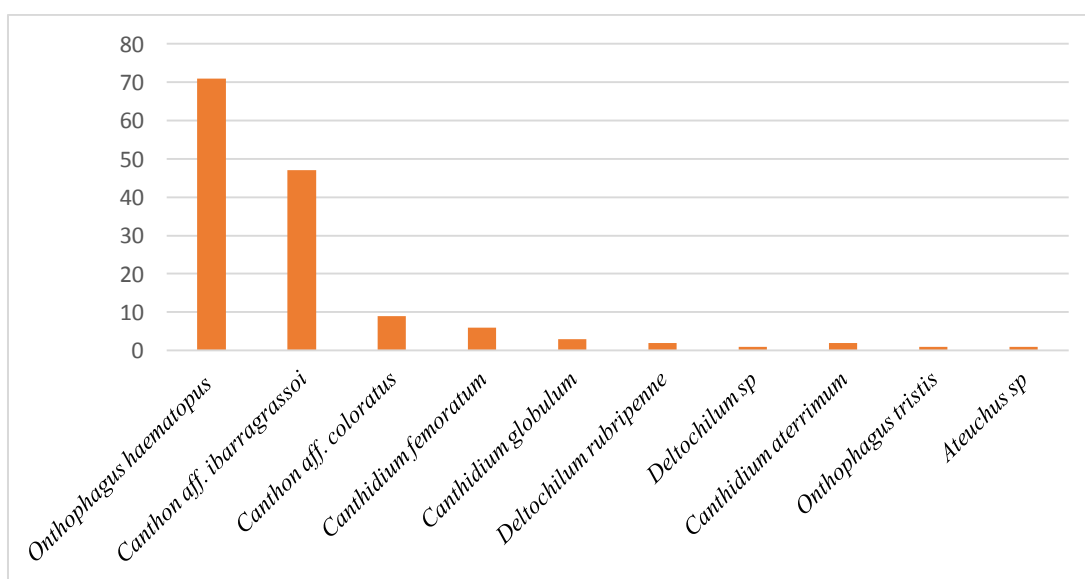


C+: controle positivo

**Figura 16-** Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR com os primers PfAlBr e PrAlBr para amplificação de fragmento do gene de cyt b de *Alouatta guariba clamitans* (580 pb) com DNA de controle positivo para bugio (*Alouatta guariba clamitans*, amostra cedida pelo DEPAVE-PMSP), 11 Amostras positivas para fezes de bugios (área de estudo), 06 amostras Negativas para fezes de bugio e controle negativo (mix com todos os reagentes, menos a amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 100 pares de bases (bp).

**10 Resultados de coleta de fezes de *Alouatta guariba clamitans* (Bugio) e de besouros no Parque Estadual da Cantareira (PEC) e no Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL) – classificação taxonômica, comportamento e número de exemplares de besouros coletados.**

Foram coletados 143 exemplares de besouros, pertencentes a 10 espécies. Na área preservada (PEC), foram obtidos 97 exemplares, sendo que as duas espécies mais abundantes foram *Canthon (Glaphyrocanton) aff. ibarragrassoi* e *Onthophagus haematopus* (gráfico 4).



**Gráfico 4- Espécies de besouros e número de exemplares coletados por busca ativa nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* no PEC e PEAL.**

Na tabela 5, são demonstrados o número de exemplares de besouros coletados e a sua distribuição nas áreas de estudo.

**Tabela 5- Besouros Scarabaeinae coletados nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* no PEC e PEAL entre 12/2016 e 12/2017**

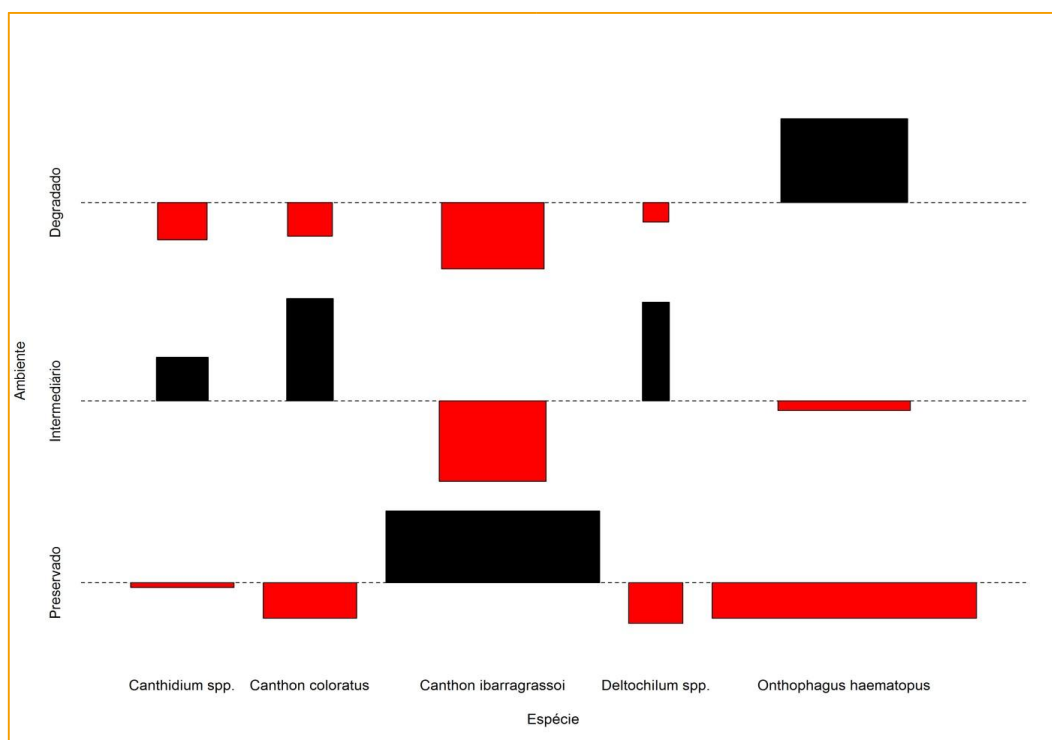
<b>Espécie</b>	<b>Preservada (PEC)</b>	<b>Intermediária (PEC)</b>	<b>Degradada (PEAL)</b>	<b>Total/ espécie</b>
<i>Onthophagus haematopus</i>	27,8% (39/97)	48% (12/25)	95,2% (20/21)	49,5% (71/143)
<i>Canthon (Glaphyrocanton) aff. ibarragrassoi.</i>	47,4% (46/97)	4,0% (1/25)	0,0%	32,9% (47/143)
<i>Canthon (Glaphyrocanton) aff. coloratus</i>	3,1% (3/97)	24% (6/25)	0,0%	6,3% (9/143)
<i>Canthidium femoratum</i>	5,2% (5/97)	4,0% (1/25)	0,0%	4,2% (6/143)
<i>Canthidium globulum</i>	1,0% (1/97)	8% (2/25)	0,0%	2,1% (3/143)
<i>Deltochilum rubripenne</i>	1,0% (1/97)	4,0% (1/25)	0,0%	2,9% (2/143)
<i>Canthidium aterrimum</i>	1,0% (1/97)	4,0% (1/25)	0,0%	2,9% (2/143)
<i>Deltochilum sp</i>	0,0%	4,0% (1/25)	0,0%	0,7% (1/143)
<i>Onthophagus tristis</i>	1,0% (1/97)	0,0%	0,0%	0,7% (1/143)
<i>Ateuchus sp</i>	0,0%	0,0%	4,8% (1/21)	0,7% (1/143)
<b>Total por área</b>	<b>67,8% (97/143)</b>	<b>17,5% (25/143)</b>	<b>14,7% (21/143)</b>	

Pontos de coleta de besouros em fezes de bugios: PEC (área preservada e intermediária) e PEAL (área degradada).

*Onthophagus haematopus* foi a espécie mais frequente nas três áreas de coleta (49,5%), seguida de *Canthon (Glaphyrocanton) aff. ibarragrassoi* (32,9%). Na área preservada (PEC), foi obtido o maior número de exemplares de besouros, representados por 8 espécies. Contudo,

na área degradada (PEAL), foram observadas apenas duas espécies de besouros, sendo *Onthophagus haematopus* a predominante (95,2%).

O gráfico 5, mostra uma associação para tabelas de contingência de duas dimensões (*Cohen-Friendly association plot*), no qual podem ser observados os desvios sob a hipótese nula de independência entre as variáveis categóricas (espécie de besouro/local de coleta-ambiente). As barras pretas e vermelhas demonstram respectivamente, que houve uma frequência maior e menor do que a esperada entre as referidas variáveis. Observa-se, por exemplo, que a espécie *Canthon aff. ibarragrassoi* foi coletada em maior número do que o esperado no ambiente preservado e em menor número do que o esperado nos demais ambientes. Isto sugere uma forte associação desta espécie com ambientes mais preservados. Neste caso, o teste exato de Fisher indicou que as variáveis “espécie” e “ambiente” **não são independentes** ( $p < 0.001$ ).



**Gráfico 5- Teste exato de Fisher sugerindo forte associação de *Canthon aff. ibarragrassoi* com os ambientes preservados ( $p < 0.001$ ).**

Na figura 17, são demonstradas as imagens de oito espécies de besouros coletados no PEC e PEAL. Infelizmente, não foi possível produzir imagens ideais das duas outras espécies coletadas nas áreas de estudo.





**Figura 17 - Fotos de besouros coprófagos coletados no PEC e PEAL:** (A) *Canthon aff. ibarragrassoi*, (B) *Onthophagus haematopus*, (C) *Onthophagus tristis*, (D) *Canthon aff. coloratus*, (E) *Canthidium femoratum*, (F) *Ateuchus sp.*, (G) *Canthidium aterrimum*, (H) *Deltochilum rubripenne*. Escala: 0,5 cm. Autor: Juarez Furhmann, 2019

Durante as coletas foram feitas algumas observações relacionadas ao comportamento dos besouros, tais como:

1 – Dentre as 149 amostras de fezes de bugios, 40 delas apresentaram exemplares de besouros, sendo que a maioria dessas amostras, apresentou somente uma espécie de besouro, com exceção de cinco delas: uma com três espécies de besouros e outras quatro amostras com duas espécies de besouros (tabela 6);

2- Foi encontrado um maior número de besouros das espécies *Onthophagus haematopus*, *Canthon aff. ibarragrassoi*, *Canthon aff. coloratus*, *Canthidium femoratum*, *Canthidium globulum*, *Ateuchus sp* e *Onthophagus tristis* no interior das amostras de fezes de bugios (ativos ou em tanatose);

3- Alguns indivíduos das espécies *Canthon aff. ibarragrassoi*, *Canthon aff. coloratus*, *Deltochilum rubripenne* e *Deltochilum sp* foram encontrados rolando o bolo fecal;

4- 4- Alguns indivíduos das espécies *Onthophagus haematopus*, *Canthon aff. coloratus*, *Canthon aff. ibarragrassoi* e *Canthidium aterrimum* foram encontrados empoleirados em folhas. A única espécie que apresentou os três comportamentos, foi *Canthon aff. coloratus* (tabela 7).

**Tabela 6- Amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans* com mais de uma espécie de besouro coletada no PEC e PEAL**

ID amostra Fezes	N. Espécies/ amostra	1	2	3	4	Total Indivíduos coletados
#294	3	7	16	0	1	24
#304	2	0	22	1	0	23
#307	2	11	1	0	0	12
#303	2	0	6	0	4	10
#295	2	3	2	0	0	5

Espécies: 1-*Onthophagus haematopus*, 2- *Canthon aff. ibarragrassoi*, 3- *Canthon aff. coloratus*, 4- *Canthidium femoratum*

**Tabela 7- Observação do comportamento das espécies de besouros Scarabaeinae coletados em busca ativa no PEC e PEAL**

Espécie	Observação do comportamento		
	No Interior das fezes	Rolando bolo fecal	Empoleiramento
<i>Onthophagus haematopus</i>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
<i>Canthon aff ibarragrassoi</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	-
<i>Canthon aff coloratus</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>Canthidium femoratum</i>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
<i>Canthidium globulum</i>	<b>X</b>	-	-
<i>Deltochilum rubripenne</i>	-	<b>X</b>	-
<i>Deltochilum sp</i>	-	<b>X</b>	-
<i>Canthidium aterrimum</i>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
<i>Onthophagus tristis</i>	<b>X</b>	--	-
<i>Ateuchus sp</i>	<b>X</b>	-	-

## 10.1 Dissecção do conteúdo intestinal dos besouros coprófagos

Os 143 exemplares de besouros do PEC e PEAL foram dissecados para a extração do conteúdo intestinal para posterior análise da presença de DNA de bugio e de plasmódio por PCR. A quantidade de fezes no interior do intestino de besouros foi classificada como: vazio, com poucas fezes e repleto de fezes (tabela 8). Não foi feita a pesagem dos conteúdos intestinais, tendo sido realizada apenas a observação visual da quantidade.

Nas primeiras dissecções realizadas, 48 besouros não foram avaliados quanto à quantidade de fezes em seus intestinos.

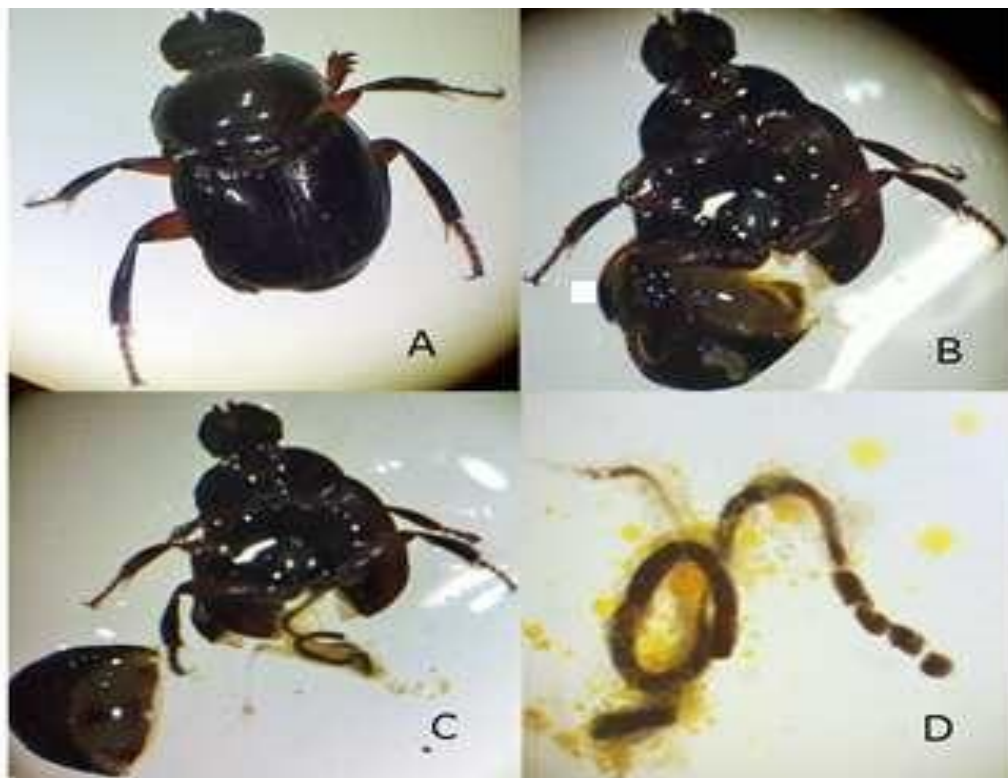
**Tabela 8- Número de besouros coprófagos coletados no PEC e PEAL submetidos a dissecção intestinal para avaliação do conteúdo fecal**

<b>Espécie/ Conteúdo fecal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Total</b>
Vazio	<b>18</b>	<b>3</b>	0	0	0	0	0	na	na	na	21
Pouco	<b>4</b>	<b>7</b>	0	0	0	0	0	na	na	na	11
Repleto	<b>8</b>	<b>37</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	0	<b>2</b>	<b>1</b>	na	na	na	95
<b>Total/besouros avaliados</b>	<b>30</b>	<b>47</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>na</b>	<b>na</b>	<b>na</b>	<b>127</b>

1 -*Onthophagus haematopus* (71 exemplares); 2- *Canthon aff. ibarragrassoi* (47); 3- *Canthon aff. coloratus* (9); 4- *Canthidium femoratum* (6);, 5- *Canthidium globulum* (3); 6- *Deltochilum rubripenne* (2); 7- *Deltochilum sp* (1);, 8- *Canthidium aterrimum* (2), 9- *Onthophagus tristis* (1); 10- *Ateuchus sp* (1).

na - não avaliados.

Na figura 18, observa-se as etapas de dissecção dos esternitos abdominais para a retirada do intestino de *Canthon aff. ibarragrassoi*, repleto de fezes.



**Figura 18 - Dissecção de intestino de *Canthon aff. ibarragrassoi*.** (A) Vista dorsal; (B) Vista ventral com os esternitos abdominais retirados; (C) Abdomen totalmente retirado; (D) Intestino dissecado e preenchido por fezes. Autora: Fabiana Santos Silva, 2018

Na figura 19, é possível comparar os intestinos vazios e repletos de fezes de dois exemplares do gênero *Dichotomius* sp.



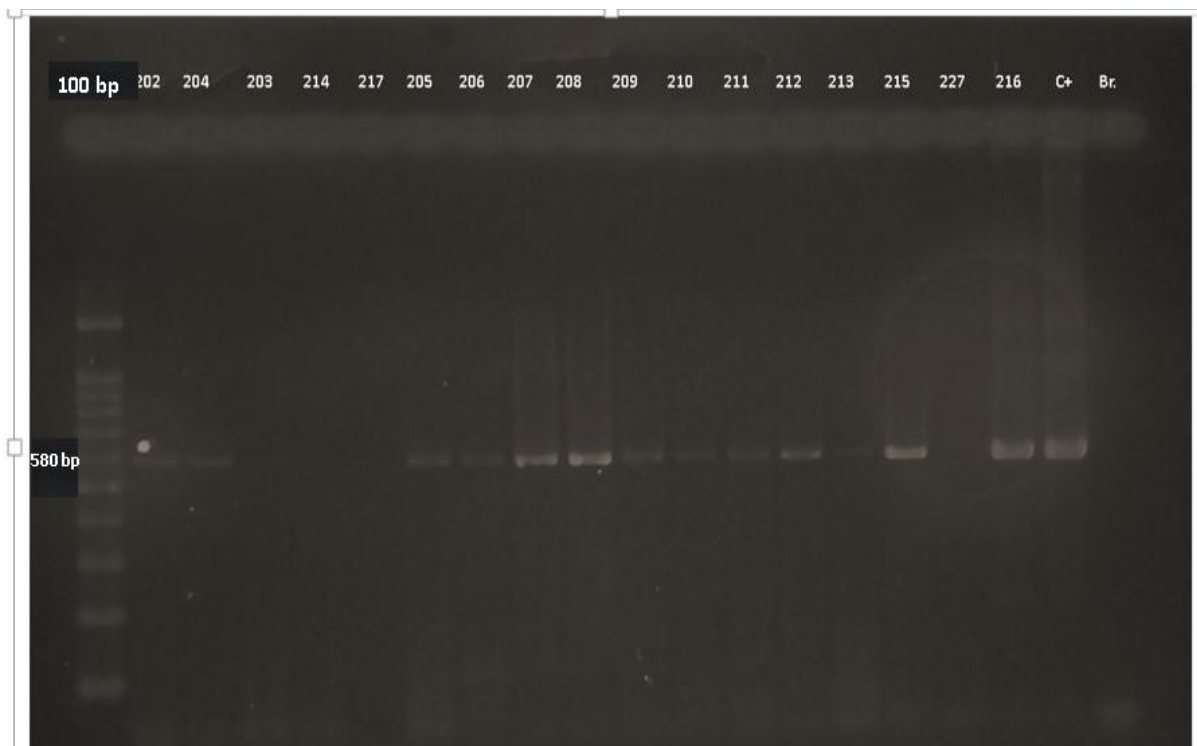
**Figura 19 – Comparação das quantidades de fezes no interior do intestino de dois exemplares de Scarabaeinae do gênero *Dichotomius* sp. (A) intestino vazio; (B) presença de fezes no intestino. Autora: Fabiana Santos Silva, 2018**

A maioria dos exemplares de *Onthophagus haematopus*, apresentaram o conteúdo intestinal vazio, sendo que apenas alguns desses tiveram seus intestinos dissecados. Todos os exemplares de *Canthon aff. ibarragrassoi* foram avaliados, sendo que a maioria apresentou o intestino repleto de fezes.

## **10.2 Resultados das análises moleculares para detecção de *Plasmodium* nas amostras de fezes de bugios (*Alouatta guariba clamitans*) e de besouros coprófagos do PEC e PEAL**

### **10.2.1 Resultados das análises moleculares das amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans***

As 149 amostras de fezes de bugios coletadas durante o estudo foram submetidas individualmente à extração de DNA, sendo que 75 delas (51%), apresentaram o fragmento correspondente de 580 pb de *cyt b* de bugio (figura 20).



**Figura 20-** Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR de *cyt b* de *Alouatta g. clamitans* em fezes coletadas no PEC e PEAL apresentando o fragmento de 580 pb. C+: Controle positivo de sangue de bugio (amostra de sangue DEPAVE/PMSP) e Br: controle negativo (*mix* com todos os reagentes, sem amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 100 pares de bases (pb).

Na PCR em tempo real para detecção de *Plasmodium* (18S rDNA) em 149 amostras de fezes de bugios, 5 delas foram positivas (3,4%), sendo 4 positivas na PCR em tempo real (18S rDNA): 3 positivas para *P. brasilianum/P. malariae* e uma positiva para *P. simium/P. vivax* e *P. brasilianum/P. malariae* (infecção mista). Uma única amostra (291) foi positiva na *Nested* PCR (*cyt b*). Esta foi submetida à reação de sequenciamento, porém a baixa qualidade da sequência não permitiu a identificação da espécie do plasmódio.

Na tabela 9, são observados os resultados das amostras de DNA de fezes positivas nos testes moleculares.

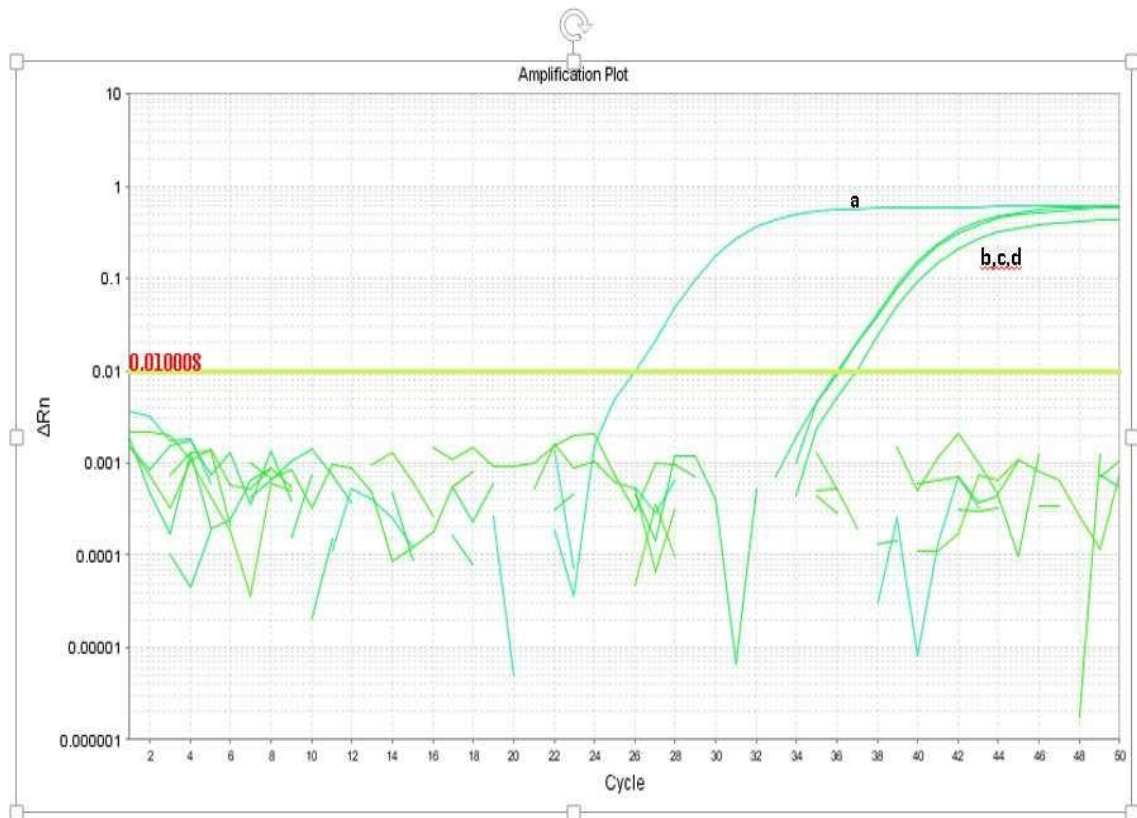
**Tabela 9- Resultados das cinco amostras de DNA de fezes de bugio do PEC e PEAL positivas nos testes moleculares**

Fezes N. amostra	Área/ data de coleta	Testes Moleculares:				
		<i>cyt b</i> <i>Alouatta</i>	18S <i>P.vivax</i>	18S <i>P.malariae</i>	<i>cyt b</i> <i>Plasmodium</i>	Sequenc.
<b>291</b>	Degradada (03/11/2017)	n	n	n	<b>Pos</b>	n
<b>303</b>	Preservada (29/11/2017)	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	n	n
<b>306</b>	Intermediária (29/11/2017)	<b>Pos</b>	n	<b>Pos</b>	n	n
<b>307</b>	Degradada 29/11/2017	n	n	<b>Pos</b>	n	n
<b>317</b>	Degradada 13/12/2017	n	n	<b>Pos</b>	n	n
<b>Total</b>		<b>2</b>	<b>1/149=0,7%</b>	<b>4/149=2,7%</b>	<b>1</b>	

n = negativo    pos = positivo

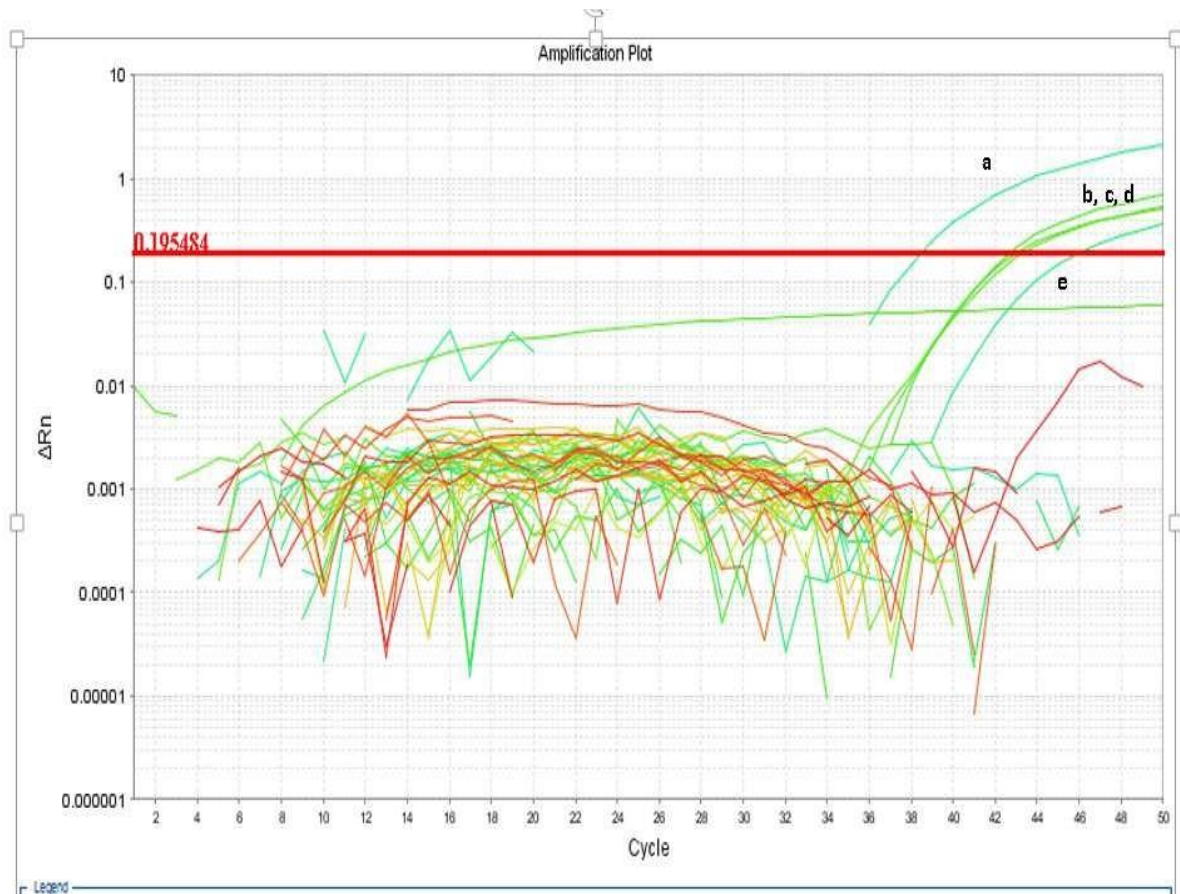
Nos gráficos 6 e 7, é possível observar as curvas de amplificação para cada amostra de fezes positivas na PCR em tempo real.





cycle: ciclos da reação  $\Delta R_n$ : quantificação da intensidade de fluorescência das amostras a cada ciclo da reação

**Gráfico 6- PCR em tempo real para fezes de bugio, amostra 303 *P. vivax*, *P. simium*, amplificação do fragmento do gene 18S rRNA de *Plasmodium vivax*/*P. simium* em amostras de DNA de fezes de bugio do PEC e PEAL. As três curvas (b, c, d) representam a amostra 303 (feita em triplicata). A curva (a), a primeira a ficar ascendente, representa o controle positivo para *Plasmodium vivax*. O controle negativo e as amostras negativas ficaram abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).**



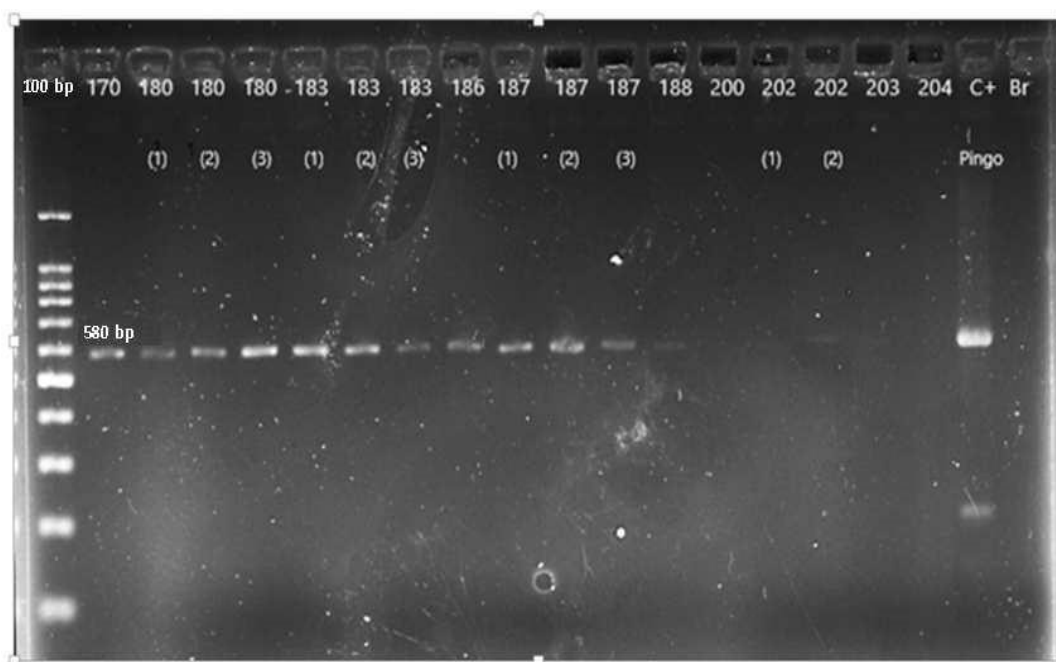
cycle: ciclos da reação  $\Delta Rn$ : quantificação da intensidade de fluorescência das amostras a cada ciclo da reação

**Gráfico 7- PCR em Tempo Real para amplificação do fragmento do gene 18SrRNA de Plasmodium malariae/P.brasilianum em amostras de DNA de fezes de bugios do PEC e PEAL. As quatro curvas (b, c, d, e) representam as amostras positivas (303, 306, 307 e 317). A curva (a), a primeira a ficar ascendente, representa o controle positivo para Plasmodium vivax. O controle negativo e as amostras negativas ficaram abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).**

## 10.2.2 Resultados dos testes moleculares com amostras de DNA dos conteúdos intestinais de besouros

Um total de 143 espécimes de besouros coletados no PEC e PEAL foram dissecados para retirada do conteúdo intestinal e submetidos individualmente à extração de DNA. Destas, 92 amostras foram positivas para *cyt b* de bugio (64,3%), confirmando a alimentação dos besouros com fezes de bugios.

Na figura 21, estão demonstradas algumas amostras de fezes positivas para *cyt b* de *Alouatta*.

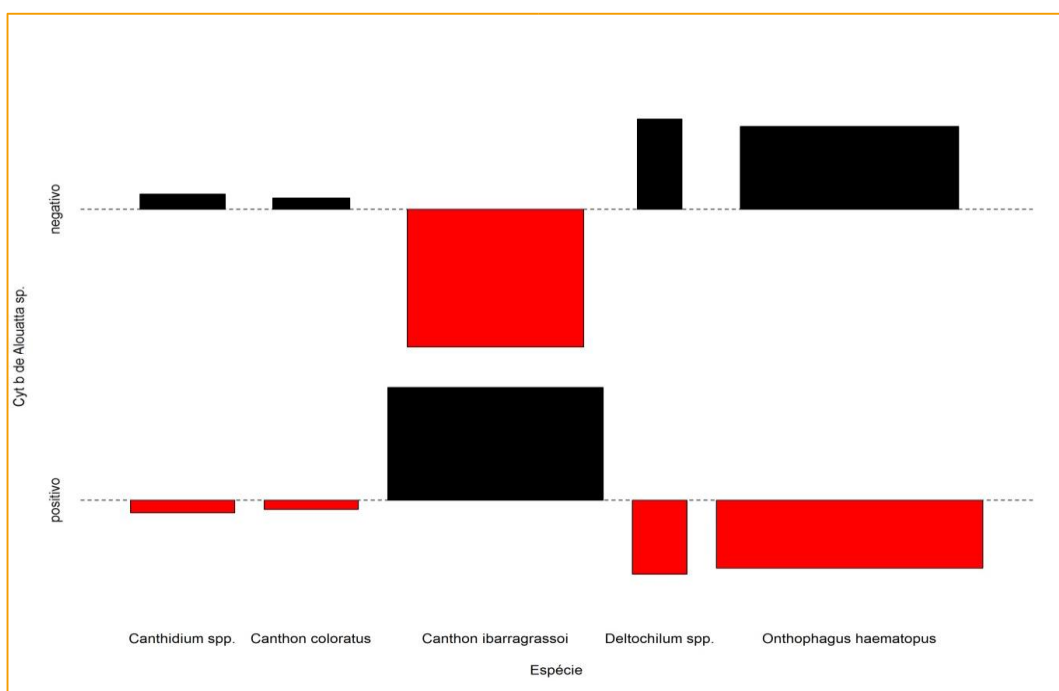


**Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR de *cyt b* de *Alouatta g. clamitans* em conteúdo intestinal de besouros coprófagos.** Algumas amostras positivas das áreas de estudo (580 bp); C+: Controle positivo de sangue de bugio (amostra de sangue DEPAVE/PMSP) e Br: controle negativo (mix com todos os reagentes, sem amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 100 pares de bases (pb).

A tabela 10 demonstra a comparação estabelecida entre as observações das quantidades de conteúdo fecal de cada espécie de besouro coletado e os resultados da PCR de *cyt b* de *Alouatta*. Foi possível verificar que 55,8% dos besouros que apresentaram conteúdo fecal, foram positivos nessa reação, especialmente os exemplares de *Canthon*

(*glaphyrocanton*) *aff. Ibarragrassoi* (81,0%). Apenas 4 besouros foram negativos para o conteúdo fecal e positivos para *cyt b*, pois possivelmente tinham vestígios de fezes de bugios no intestino.

O teste exato de Fisher indica que as variáveis espécie e *cyt b* de *Alouatta* **não são independentes** ( $p < 0.001$ ). O gráfico 8, indica que *Canthidium* spp., *Canthon aff. coloratus*, *Deltochilum* spp. e *Onthophagus haematopus* apresentaram menos positivos para *cyt b* de *Alouatta* e mais negativos do que o esperado. Por sua vez, a espécie *Canthon aff. ibarragrassoi*, apresentou mais positivos para *cyt b* de *Alouatta* e menos negativos do que o esperado. Isto sugere que esta última espécie seja a mais associada às fezes de bugios em comparação às demais.



**Gráfico 8- Teste exato de Fisher sugerindo forte associação de *Canthon aff. ibarragrassoi* às fezes de bugios ( $p < 0.001$ ).**

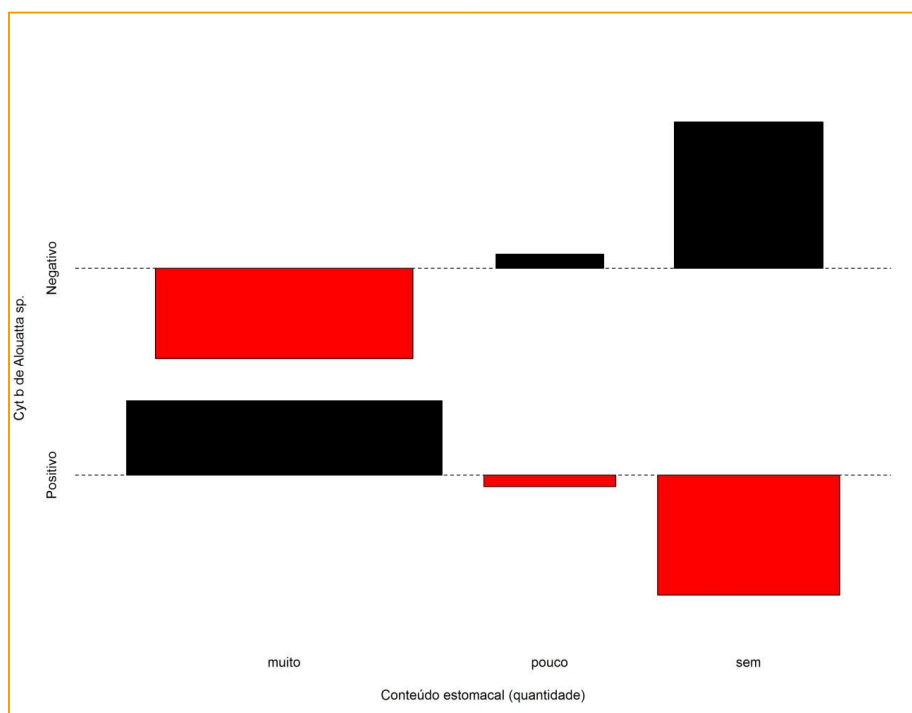
**Tabela 10- Comparação entre os resultados da avaliação da quantidade de conteúdo fecal de intestino de besouros coprófagos coletados no PEC e PEAL e a PCR de *cyt b* de *Alouatta g. clamitans***

Espécie (N. total coletados)	N. besouros comparados	Conteúdo fecal (Con) /Cyt b			
		Con+/Cyt b±	Con+/Cyt b-	Con-/Cyt b±	Cont-/Cyt b-
<i>Onthophagus haematopus</i> (71)	30	6	6	3	15
<i>Canthon</i> ( <i>glaphyrocanthon</i> ) aff. <i>ibarragrassoi</i> (47)	47	38	6	1	2
<i>Canthon</i> ( <i>Glaphyrocanthon</i> ) aff. <i>coloratus</i> (9)	9	5	4	0	0
<i>Canthidium femoratum</i> (6)	6	4	2	0	0
<i>Canthidium globulum</i> (3)	nf	nf	nf	nf	nf
<i>Deltochilum rubripenne</i> (2)	2	0	2	0	0
<i>Canthidium aterrimum</i> (2)	nf	nf	nf	nf	nf
<i>Deltochilum sp</i> (1).	1	0	1	0	0
<i>Onthophagus tristis</i> (1)	nf	nf	nf	nf	nf
<i>Ateuchus sp.</i> (1)	nf	nf	nf	nf	nf
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>53</b> (55,8%)	<b>21</b> (22,1%)	<b>4</b> (4,2%)	<b>17</b> (17,9%)

nf – não feito

Os besouros que apresentaram resultados positivos para conteúdo intestinal e negativos para *cyt b* de *Alouatta* (22,1%), possivelmente tinham em seus intestinos fezes de outros animais. Apenas 17,9% dos besouros, foram negativos para o conteúdo intestinal e no teste *cyt b*.

No gráfico 9, novamente o teste exato de Fisher indica que as variáveis conteúdo e *cyt b* de *Alouatta* **não são independentes** ( $p < 0.001$ ), observou-se uma frequência maior do que a esperada de ‘positivos’ e frequência menor do que a esperada de ‘negativos’ para amostras de besouros com conteúdo intestinal “repleto” de fezes. Por sua vez, besouros com pouco ou sem conteúdo intestinal, apresentaram frequência menor do que a esperada para *cyt b* positivo e maior do que a esperada para negativo.



**Gráfico 9 - Teste de Fisher sugerindo forte associação entre conteúdos intestinais de besouros “repletos” de fezes e melhor detecção de *cyt b* de *Alouatta* ( $p < 0.001$ ).**

As 143 amostras de DNA de conteúdo intestinal de besouros também foram testadas quanto à presença de DNA de *Plasmodium* na PCR em tempo real (18S), sendo que os resultados positivos foram confirmados em duas reações subsequentes. As amostras foram testadas também na Nested-PCR para detecção de *cyt b* de *Plasmodium* (tabela 11).

**Tabela 11- Resultados dos testes moleculares com DNA extraído do conteúdo intestinal dos besouros coletados nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* do PEC e PEAL**

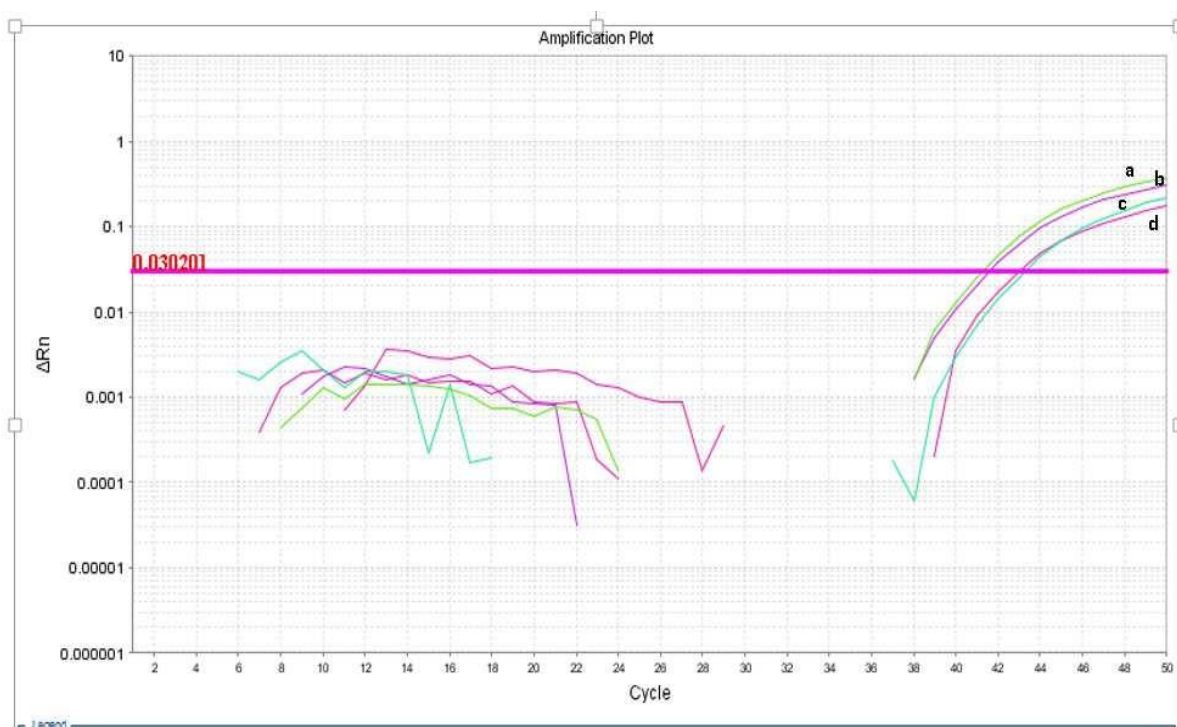
Espécie	N	Testes			Moleculares	
		<i>cyt b</i> <i>Alouatta</i>	18S Ps/Pv	18S Pb/Pm	<i>cyt b</i> <i>Plasmodium</i>	Sequenc.
<i>Onthophagus haematopus</i>	71	<b>43 (60,5%)</b>	<b>1 (1,4%)</b>	<b>3 (4,2%)</b>	<b>3 (4,2%)</b>	<b>2 (1,4%)</b> ( <i>P. simium</i> )
<i>Canthon (glaphyrocanthon)</i> <i>aff. ibarragrassoi.</i>	47	<b>39 (83,0%)</b>	<b>2 (4,3%)</b>	<b>1 (2,1%)</b>	<b>1 (2,1%)</b>	0 (0,0%)
<i>Canthon</i> ( <i>Glaphyrocanthon</i> ) <i>aff.</i> <i>coloratus</i>	9	3 (33,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<i>Canthidium femoratum</i>	6	3 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<i>Canthidium globulum</i>	3	2 (66,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<i>Deltochilum rubripenne</i>	2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<i>Canthidium aterrimum</i>	2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<i>Deltochilum sp</i>	1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<i>Onthophagus tristis</i>	1	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<i>Ateuchus sp</i>	1	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	nf
<b>Total</b>	<b>143</b>	<b>92 (64,3%)</b>	<b>3 (2,1%)</b>	<b>4 (2,8%)</b>	<b>4 (2,8%)</b>	<b>2 (1,4%)</b>

Ps/Pv=*P. simium*/*P. vivax* Pb/Pm=*P. brasilianum*/*P. malariae* nf=não feito Sequenc=sequenciamento

O resultado mais expressivo ocorreu com *Onthophagus haematopus*, que apresentou positividade de 60,5% quanto à presença de DNA de bugio no conteúdo intestinal, sendo que foram detectados por PCR em tempo real (18S) o *P. brasilianum*/*P. malariae* (4,2% - 3/71) e o *P. simium*/*P. vivax* (1,4% - 1/71). Das três amostras positivas para *cyt b* (Nested PCR), 2 delas foram sequenciadas e houve confirmação do encontro de *P. simium*.

*Canthon (glaphyrocanton) aff. ibarragrassoi* também apresentou conteúdo intestinal positivo para *P. brasilianum/P. malariae* (2,1% - 2/47) e *P. simium/P. vivax* (4,3% - 2/47) e apesar da tentativa de sequenciar a única amostra positiva para *cyt b*, o mesmo foi inconclusivo.

Nos gráficos 10 e 11, estão demonstradas as amostras de DNA de conteúdos intestinais de besouros que foram positivas para *P. malariae* na PCR em tempo real no PEC e PEAL.

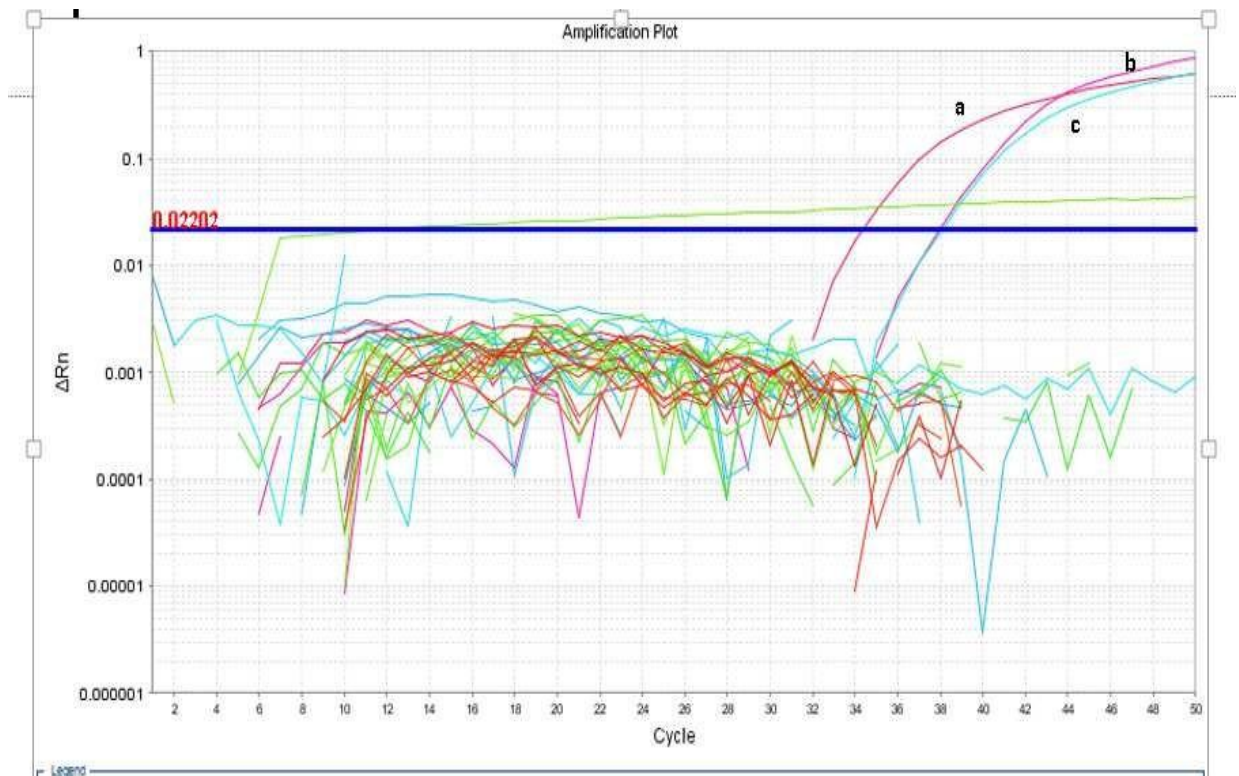


cycle: ciclos da reação    ΔRn: quantificação da intensidade de fluorescência das amostras a cada ciclo da reação

**Gráfico 10- PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA de Plasmodium malariae/P.brasilianum em três amostras de conteúdo intestinal besouro do PEC e PEAL (262-1, 291 e 303-5), um controle positivo para *P. brasilianum* de sangue de macaco *Saimiri* infectado experimentalmente com cepa Peru I T1726/2008, cedida pelo Dr. William Collins, CDC/Atlanta) e um controle negativo. As curvas (a), (c), (b), representam respectivamente, as amostras 262-1, 291, 303-5 positivas e a curva (d), o controle positivo para *P. malariae*. O controle negativo ficou abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).**

A quarta amostra de conteúdo intestinal de besouro positiva para *P. malariae* está representada no gráfico 11.

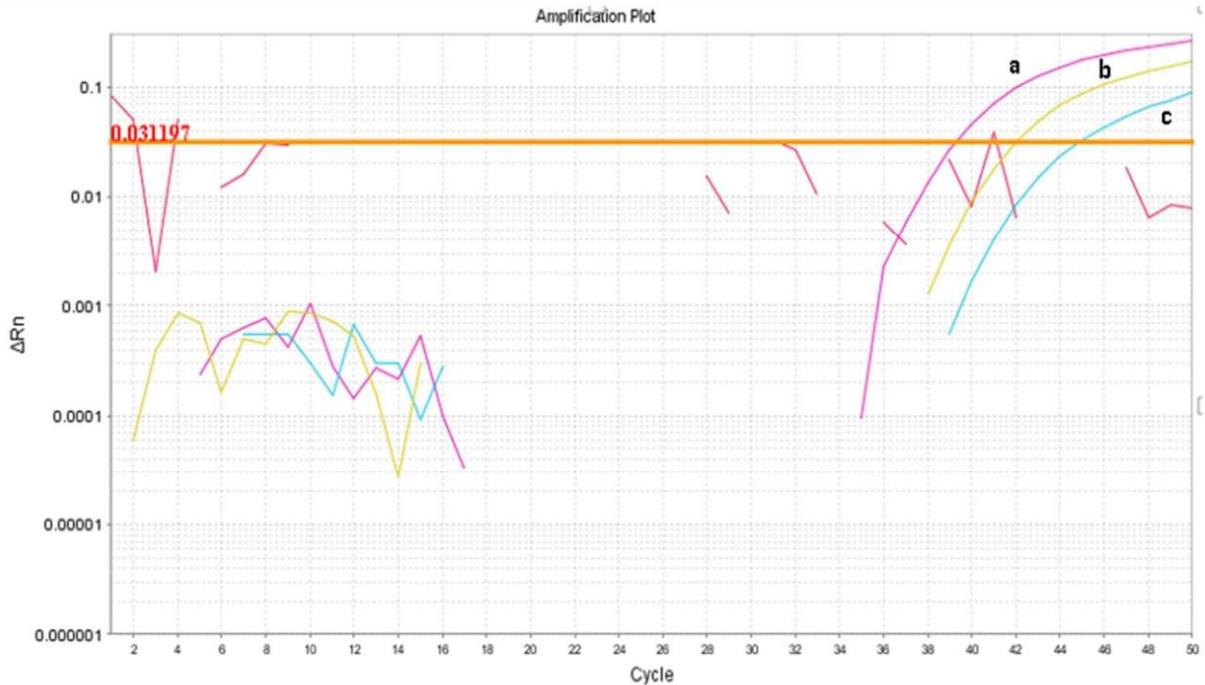




*cycle*: ciclos da reação  $\Delta Rn$ : quantificação da intensidade de fluorescência das amostras a cada ciclo da reação.

**Gráfico 11- PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA de *Plasmodium malariae*/P.brasilianum em uma amostra de conteúdo intestinal de besouro do PEC e PEAL.** A curva (c) representa a amostra 310-1 positiva de conteúdo intestinal de besouro e as curvas (a, b) representam duas amostras de controle positivo de *P. malariae* de sangue de macaco *Saimiri* infectado experimentalmente com cepa Peru I T1726/2008, cedida pelo Dr. William Collins, CDC/Atlanta). O controle negativo ficou abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).

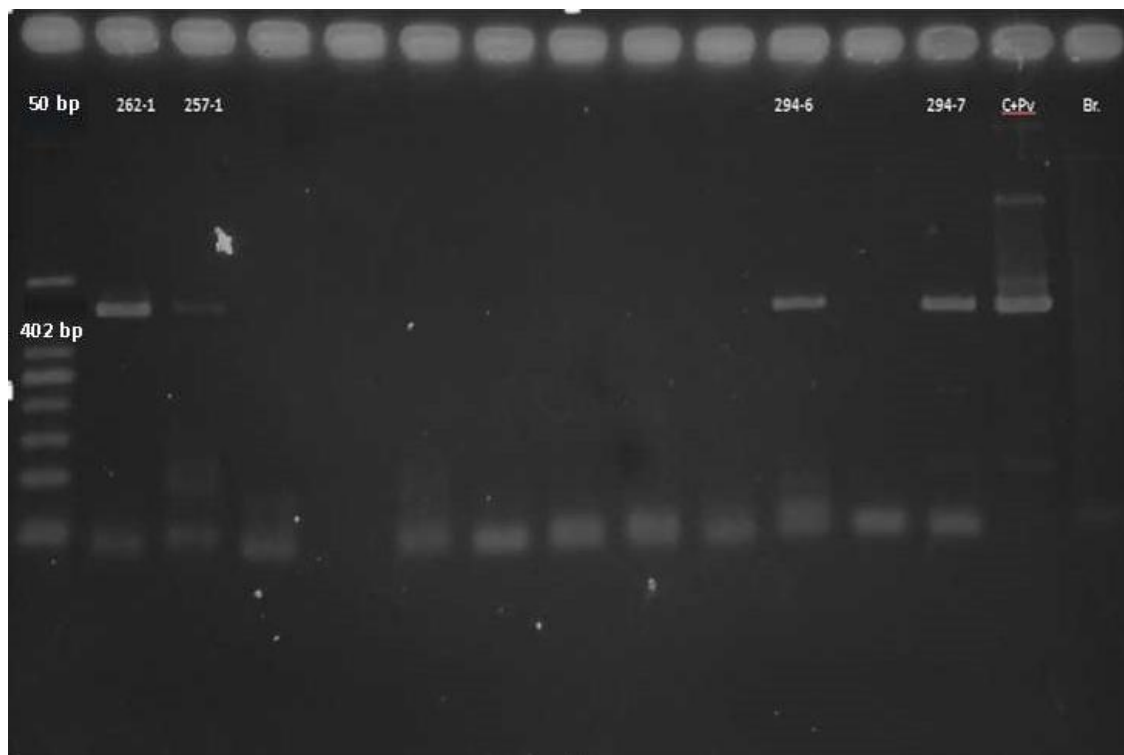
No gráfico 12 é possível observar três amostras de conteúdo intestinal de besouro do PEC e PEAL positivas para *P. vivax*.



cycle: ciclos da reação     $\Delta Rn$ : quantificação da intensidade de fluorescência das amostras a cada ciclo da reação.

**Gráfico 12- PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA de Plasmodium vivax/P.simum em três amostras de intestino de besouro do PEC e PEAL e um controle negativo.** As curvas (b), (c) e (a), representam as amostras 294-6, 303-8 e 257-1 positivas de conteúdo intestinal de besouro. Nessa reação não foi colocado o controle positivo para *Plasmodium vivax*. O controle negativo ficou abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).

Na figura 22, estão demonstrados os fragmentos positivos para *cyt b* de dois besouros da espécie *Onthophagus haematopus* (262-1 e 294-7) que foram posteriormente purificados e sequenciados. As amostras (257-1 e 294-6) também foram submetidas à reação de sequenciamento, porém a baixa qualidade das sequências não permitiu a identificação da espécie do plasmódio.



**Figura 22-** Eletroforese em gel de agarose a 2% - PCR para amplificar o fragmento do gene *cyt b* de *Plasmodium* (402 bp) em conteúdo intestinal de besouros do PEC e PEAL. Amostras 262-1 e 294-7 de conteúdo intestinal de *Onthophagus haematopus* que apresentaram o fragmento positivo. C<sup>+</sup>Pv: Controle positivo (sangue de paciente da região amazônica) e Br: controle negativo (mix com todos os reagentes, sem amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 50 pares de bases (pb).

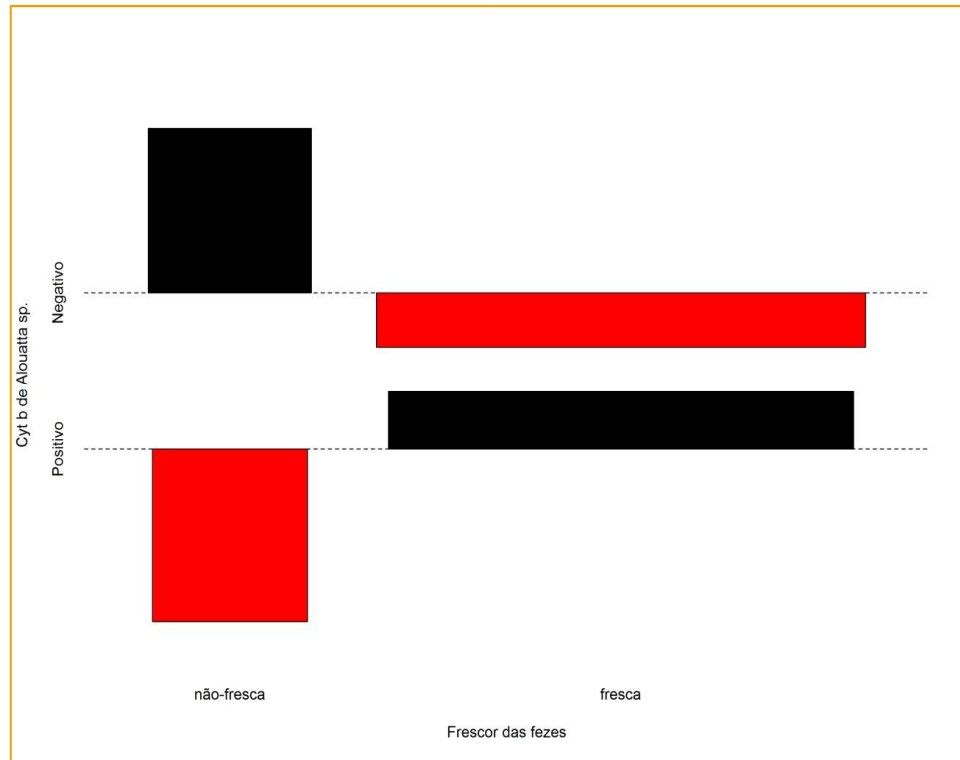
### 10.2.3 Resultados comparativos entre as amostras de fezes de bugios e os besouros positivos para *Plasmodium*.

Durante a coleta de fezes de bugios, foram feitas observações quanto à característica “frescor” destas no momento da coleta. Dentre as 149 amostras coletadas, 123 estavam frescas (82,5%), sendo que a maioria dos resultados positivos para plasmódio ocorreu entre as amostras frescas (4,9% - 6/123). Apenas duas amostras estavam secas e foram positivas para plasmódio. As amostras de fezes nas quais foram encontrados os besouros que apresentaram resultados positivos para plasmódio, também estavam frescas (Tabela 12).

**Tabela 12- Característica das amostras de fezes de bugios consumidas pelos besouros coprófagos que foram positivos para *Plasmodium* no momento da coleta no PEC e PEAL**

Amostras de fezes	Presença de Besouros		Característica das fezes
	Sim	Não	
291		X	Seca
303		X	Fresca
306		X	Fresca
307		X	Fresca
317		X	Fresca
257-1	X		Fresca
262-1	X		Fresca
291-1	X		Seca
294-6	X		Fresca
294-7	X		Fresca
303-5	X		Fresca
303-8	X		Fresca
310-1	X		Fresca

O teste exato de Fisher indica **independência** entre as variáveis “frescor” e *cyt b* de *Alouatta* ( $p= 0.607$ ). No gráfico 13, é possível observar que, embora fezes frescas tenham apresentado positividade pouco maior do que a esperada, não se pode afirmar com base nas amostras analisadas, que *cyt b* de *Alouatta* tenha maior probabilidade de ser detectado em fezes frescas quando comparado à detecção observada em fezes não-frescas.



**Gráfico 13-** Teste de Fisher não relaciona “frescor” das fezes com a detecção de *cyt b* de *Alouatta* ( $p= 0.607$ ).

Os resultados comparados entre as amostras positivas para fezes de bugio e/ou conteúdo intestinal de besouros estão demonstrados na tabela 13.

**Tabela 13- Resultados comparados entre as amostras positivas de fezes de bugios e/ou conteúdo intestinal de besouros nos testes moleculares**

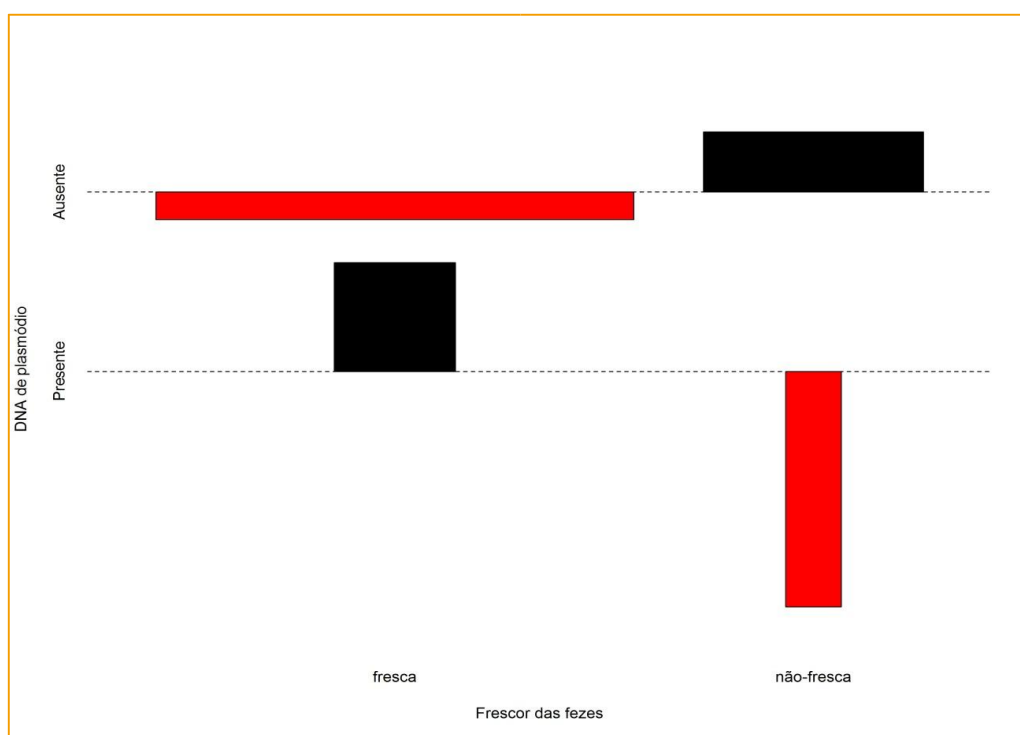
Amostras			Testes moleculares				
Fezes	Besouro	Espécie	<i>cyt b</i> <i>Alouatta</i>	18S Ps/Pv	18S <i>Pb/Pm</i>	<i>cyt b</i> Plasm	Sequenc
<b>257</b>			n	n	n	n	-
	257-1	<i>Onthophagus haematopus</i>	Pos	Pos	n	Pos	N
<b>262</b>			n	n	n	n	-
	262-1	<i>Onthophagus haematopus</i>	n	n	Pos	Pos	<i>P. simium</i>
<b>291</b>			n	n	n	Pos	N
	291-1	<i>Onthophagus haematopus</i>	n	n	Pos	n	-
<b>294</b>			n	n	n	n	-
	294-6	<i>Canthon aff. ibarragrassoi</i>	Pos	Pos	n	Pos	N
	294-7	<i>Onthophagus haematopus</i>	neg	n	n	Pos	<i>P. simium</i>
<b>303</b>			Pos	<u>Pos</u>	<u>Pos</u>	n	-
	303-5	<i>Canthon aff. ibarragrassoi</i>	Pos	n	<u>Pos</u>	n	-
	303-8	<i>Canthon aff. ibarragrassoi</i>	Pos	<u>Pos</u>	n	n	-
<b>306</b>	s/bes pos	-	Pos	n	Pos	n	-
<b>307</b>	s/bes pos	-	n	n	Pos	n	-
<b>310</b>			n	n	n	n	-
	310-1	<i>Onthophagus haematopus</i>	n	n	Pos	n	-
<b>317</b>	s/bes pos	-	n	n	Pos	n	-

plasm=plasmódio sequenc=sequenciamento pos=positivo n=negativo s/bes pos=sem besouro positivo

Vale ressaltar que a amostra 303 de fezes de bugio foi positiva para *P. simium/P. vivax* e *P. brasilianum/P. malariae* e apresentou dois besouros da espécie *Canthon aff. Ibarragrassoi* no momento da coleta. Cada um deles, foi positivo para 18S de *P. simium/P. vivax* (303-8) e *P. brasilianum/P. malariae* (303-5), sendo que as três amostras (303/fezes; 303-5 e 3038/besouros) também foram positivas para *cyt b* de *Alouatta guariba clamitans*.

O teste exato de Fisher indica independência entre as variáveis ( $p=1$ ). Isto sugere que **não** se pode afirmar com base nos dados observados que exista uma relação entre frescor das fezes e detecção de DNA de plasmódio.

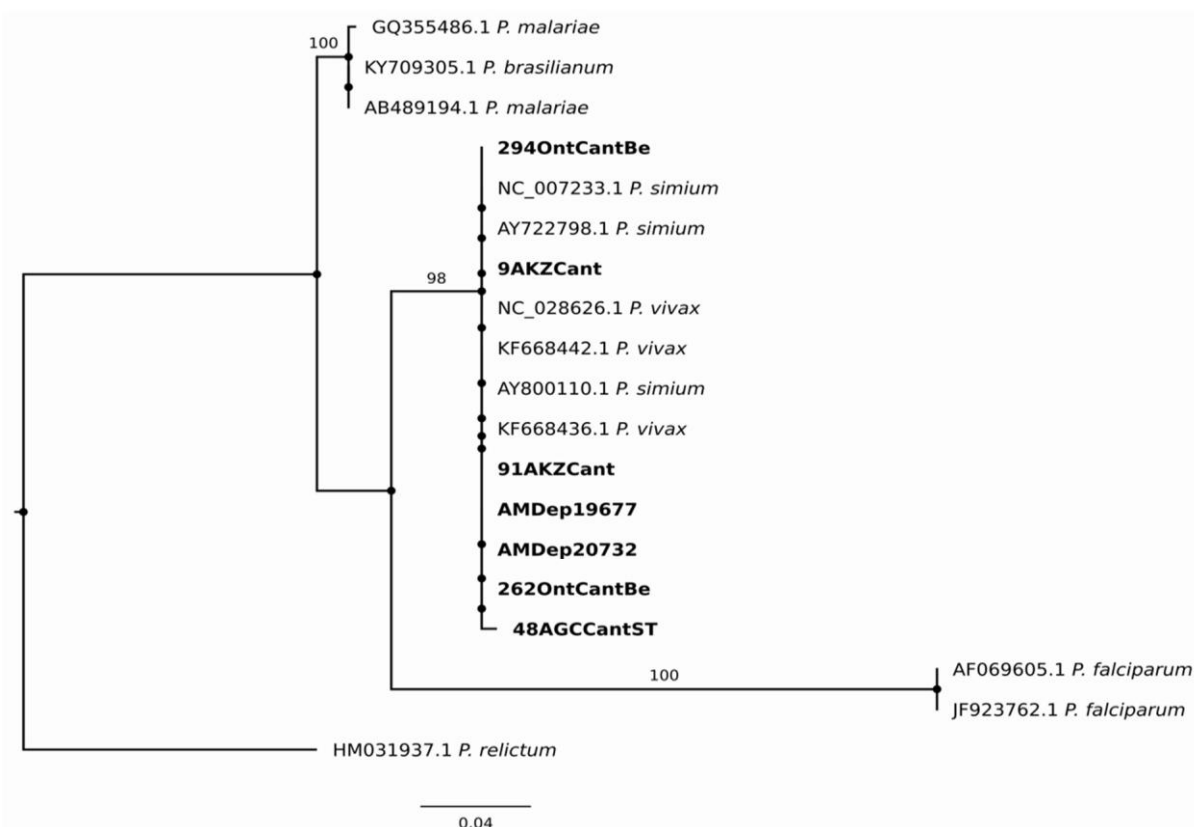
O gráfico 14 indica que ocorreu um número maior do que o esperado de positivos nas fezes frescas. No entanto, o baixo  $n$  de positivos (DNA de plasmódio presente) e a elevada quantidade de negativos (DNA de plasmódio ausente) pode ter tido influência nos resultados obtidos.



**Gráfico 14 - Teste de Fisher não relaciona “frescor” das fezes com a detecção de *cyt b* de *Plasmodium* ( $p= 1$ ).**

#### 10.2.4 Identificação molecular das amostras de besouros com conteúdo intestinal positivo para *cyt b* de *Plasmodium*.

Foram obtidas sequências de *cyt b* de duas amostras de intestino de besouro. Estas foram identificadas como 262OntCantBe e 294OntCantBe, sendo que as sequências obtidas foram de 150 pb e 212 pb, respectivamente. Na filogenia com sequências de outras espécies de *Plasmodium* (figura 23), as sequências de *cyt b* dos *Plasmodium* isolados a partir do intestino de besouro se agruparam com elevado suporte com sequências de *P. simium*/*P. vivax* obtidas no GenBank. As referidas sequências também se agruparam com amostras de fezes (91AKZCant e 48AGCCantST) e sangue (AMDep19677 e AMDep20732) de macaco bugio e um mosquito anofelino (9AKZCant), todos coletados em pesquisas anteriores na região da Serra da Cantareira.

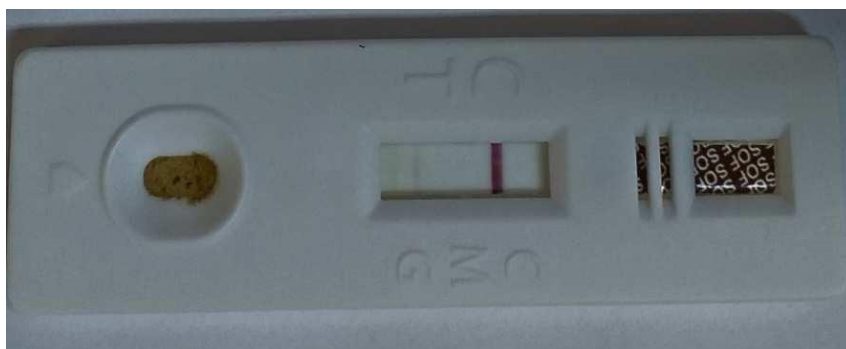


**Figura 23 – Filogenia das sequências de *cyt b* de *Plasmodium* das amostras de conteúdo intestinal de besouros do PEC e PEAL.** Valores acima dos ramos representam suporte de bootstrap. Em negrito, estão marcadas as sequências provenientes de amostras da região da Serra da Cantareira.



### 10.2.5 Teste de sangue oculto nas amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans* do PEC e PEAL (Teste Rápido Imunocromatográfico)

As 149 amostras de fezes de bugios foram submetidas ao teste de sangue oculto, sendo que 4 delas foram positivas. Contudo, estas não foram positivas quanto à presença de DNA de *Plasmodium* (figura 24).

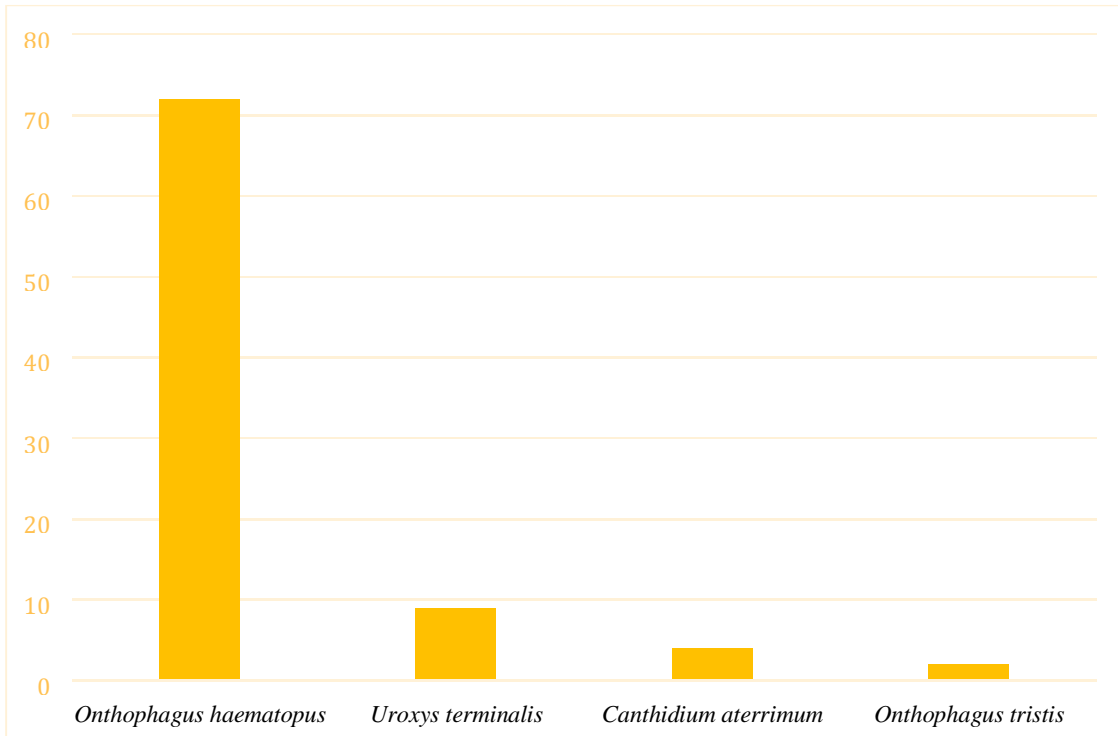


**Figura 24- Placa teste para sangue oculto nas fezes com amostras do PEC e PEAL.** Fezes colocadas na cavidade circular. O resultado é considerado positivo quando a banda C (área controle positivo) e a banda T (área teste/amostra) são visualizadas. Autora: Fabiana Santos Silva

### 10.3 Besouros coletados nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* (bugios) no Instituto de Botânica de São Paulo (IBot)

No IBot foram coletadas 76 amostras de fezes de bugios entre 08/2018 e 06/2019, sendo que 23 delas, apresentaram besouros (gráfico 15).

Foram identificados 87 exemplares de besouros, pertencentes a 4 espécies, sendo que 35 deles foram coletados na Trilha Marginal 1, 25 na Trilha Marginal 2, 24 na Trilha da Nascente e 3 na Trilha Divisa Zoológico. As duas espécies mais frequentes de besouros foram *Onthophagus haematopus* e *Uroxys terminalis*.



**Gráfico 15 - Espécies de besouro e número de exemplares coletados por busca ativa nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* no Instituto de Botânica (IBot).**

O número de exemplares coletados, bem como a distribuição dos espécimes por local de coleta estão demonstrados na tabela 14.

**Tabela 14- Besouros Scarabaeinae coletados nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* no IBot em coletas realizadas entre 08/2018 e 06/2019**

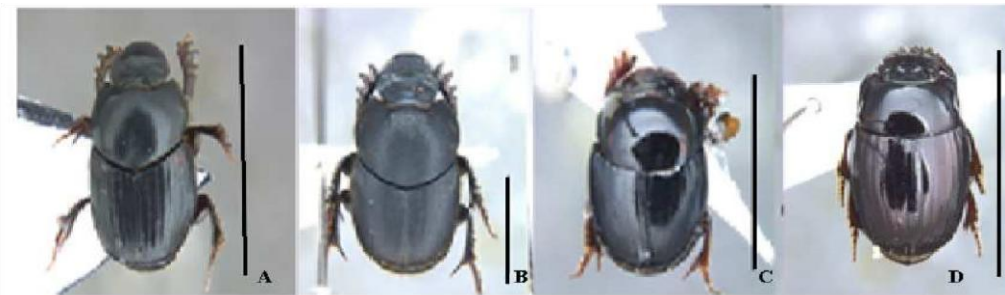
<b>Espécie</b>	<b>Trilha Marginal (Direita)</b>	<b>Trilha Marginal (Esquerda)</b>	<b>Trilha da Nascente (Suspensa)</b>	<b>Trilha Divisa Zoológico)</b>	<b>Total/ espécie</b>
<i>Onthophagus haematopus</i>	85,7% (30/35)	96% (24/25)	62,5% 15/24	100% (3/3)	82,8% (72/87)
<i>Uroxys terminalis</i>	0	0	37,5% (9/24)	0	10,3% (09/87)
<i>Canthidium aterrimum</i>	8,6% (3/35)	4% (1/25)	0	0	4,6% (04/87)
<i>Onthophagus tristis</i>	5,7% (2/35)	0	0	0	2,3% (2/87)
<b>Total por área</b>	<b>40,2%</b> <b>(35/87)</b>	<b>28,7%</b> <b>(25/87)</b>	<b>27,6%</b> <b>(24/87)</b>	<b>3,4%</b> <b>(3/87)</b>	

*Onthophagus haematopus* foi a espécie mais frequente (82,8%) nos quatro pontos de coleta no IBot, sendo *Uroxys terminalis*, a segunda espécie mais coletada (10,3%), porém, encontrada apenas na trilha da Nascente.

*Onthophagus haematopus*, *Canthidium aterrimum* e *Onthophagus tristis* foram coletadas na Trilha Marginal Direita, área com maior número de indivíduos.

Na Trilha Marginal Esquerda, o *Onthophagus haematopus* foi a espécie mais coletada e na Trilha Divisa Zoológico foi encontrado o menor número de espécies, porém o *Onthophagus haematopus* também foi encontrado, indicando a possibilidade de ser uma espécie mais associada às fezes de bugios.

Na figura 25, estão demonstrados exemplares de cada espécie coletada no IBot.



**Figura 25 - Fotos dos besouros coprófagos coletados no IBot (A) *Onthophagus haematopus* (B) *Onthophagus tristis* (C) *Canthidium aterrimum* (D) *Uroxys terminalis* Escala: 0,5 cm. Autor: Juares Furhmann, 2019**

Durante as coletas foram feitas algumas observações relacionadas ao comportamento dos besouros, tais como:

1 Exemplares de besouros foram coletados em 23/76 amostras de fezes, sendo que uma amostra apresentou três espécies e outra, duas espécies. Contudo, a maioria das amostras continha apenas uma espécie de besouro (Tabela 15);

2 A maioria dos besouros coletados foram encontrados no interior das fezes (ativo ou em tanatose), tais como *Onthophagus haematopus*, *Canthidium aterrimum*, *Onthophagus tristis* e *Uroxys terminalis*;

3 Nenhuma das espécies coletadas no IBot foi observada rolando o bolo fecal;

4 O empoleiramento em folhas foi observado na espécie *Canthidium aterrimum* (Tabelas 15 e 16).

**Tabela 15- Amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans* com mais de uma espécie de besouro coletada no IBot**

ID amostra Fezes	N. espécies/ amostra	1	2	3	4	Total exemplares
#68	3	2	0	1	2	5
#52	2	5	9	0	0	14
#50	2	1	0	1	0	2
#25	2	2	0	1	0	3
#15	2	2	0	1	0	3

Espécies de besouro: 1- *Onthophagus haematopus*, 2- *Uroxys terminalis*, 3- *Canthidium aterrimum*, 4- *Onthophagus tristis*.

**Tabela 16- Observação do comportamento das espécies de besouros Scarabaeinae coletados em busca ativa no IBot**

Espécies de besouro	Observação do comportamento		
	No interior das fezes	Rolando bolo fecal	Empoleiramento
<i>Onthophagus haematopus</i>	X	-	-
<i>Canthidium aterrimum</i>			X
<i>Onthophagus tristis</i>	X X	- -	-
<i>Uroxys terminalis</i>	X	-	-

Na tabela 17, é possível observar a quantidade de fezes presentes no interior dos intestinos dos 87 besouros dissecados do IBot, sendo que a maioria deles estavam com o órgão repleto de fezes.

**Tabela 17- Número de besouros coletados no IBot que foram dissecados e avaliados de acordo com a observação da quantidade de fezes no intestino**

Espécies de besouro/ Quant. fezes	1	2	3	4
Vazio	0	0	0	
Pouco	12	3	1	
Repleto	60	6	3	0
<b>Total (besouros avaliados)</b>	<b>72</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>2</b>

Espécies de besouro: 1- *Onthophagus haematopus*, 2- *Uroxys terminalis*, 3- *Canthidium aterrimum*, 4- *Onthophagus tristis*

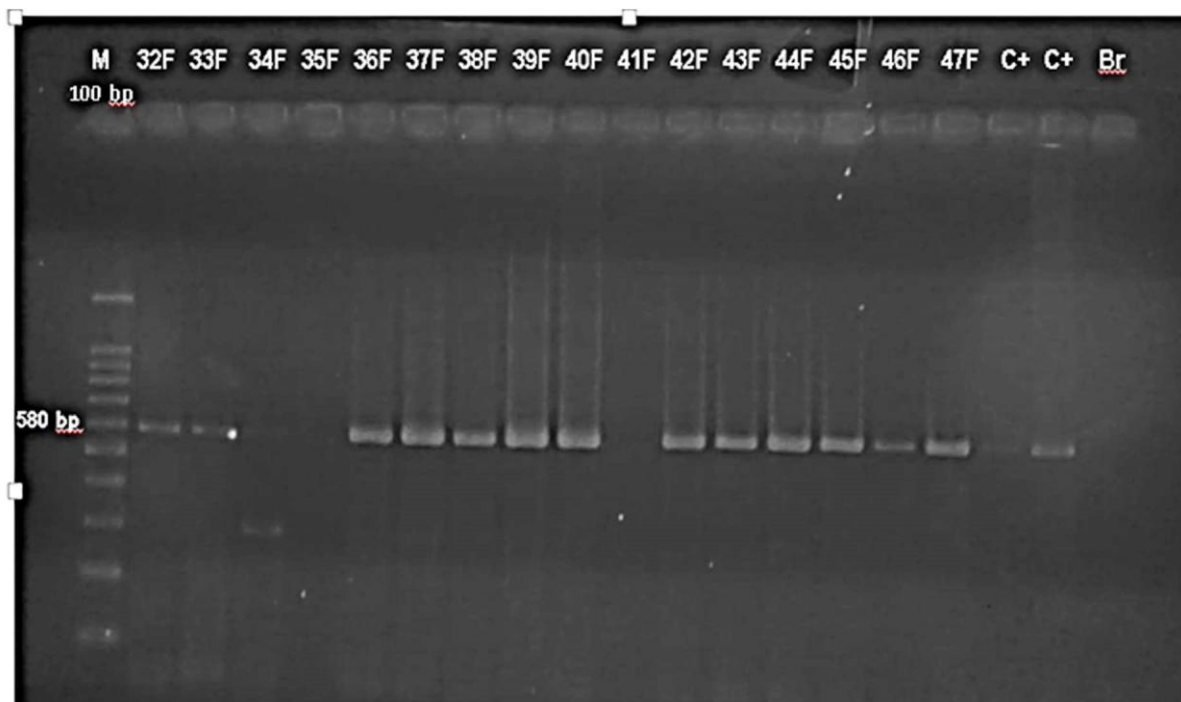
### 10.3.1 Resultados das análises moleculares para detecção de *Plasmodium* nas amostras de fezes de bugios (*Alouatta guariba clamitans*) e de besouros coprófagos do IBot

### 10.3.2 Resultados das amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans*

As 76 amostras de fezes coletadas e dissecadas durante o estudo foram submetidas individualmente à extração de DNA.

Na técnica de PCR para identificação DNA do hospedeiro, dentre as 76 amostras de fezes coletadas durante o estudo 45 foram positivas para *cyt b* de bugio (60%).

É possível observar algumas amostras de fezes de bugios positivas apresentando o fragmento correspondente de 580 pb de *cyt b*, figura 26.



**Figura 26-** Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR para amplificar o fragmento de *cyt b* de *Alouatta g. clamitans* em fezes coletadas no IBot. Amostras positivas (580 bp), controle positivo de sangue de bugio (Pingo) (*Alouatta guariba clamitans*) e controle negativo (sem amostra de DNA).

### 10.3.3 Resultados de *cyt b* de plasmódio e 18s rRNA (Taqman) nas amostras de fezes coletadas no IBot

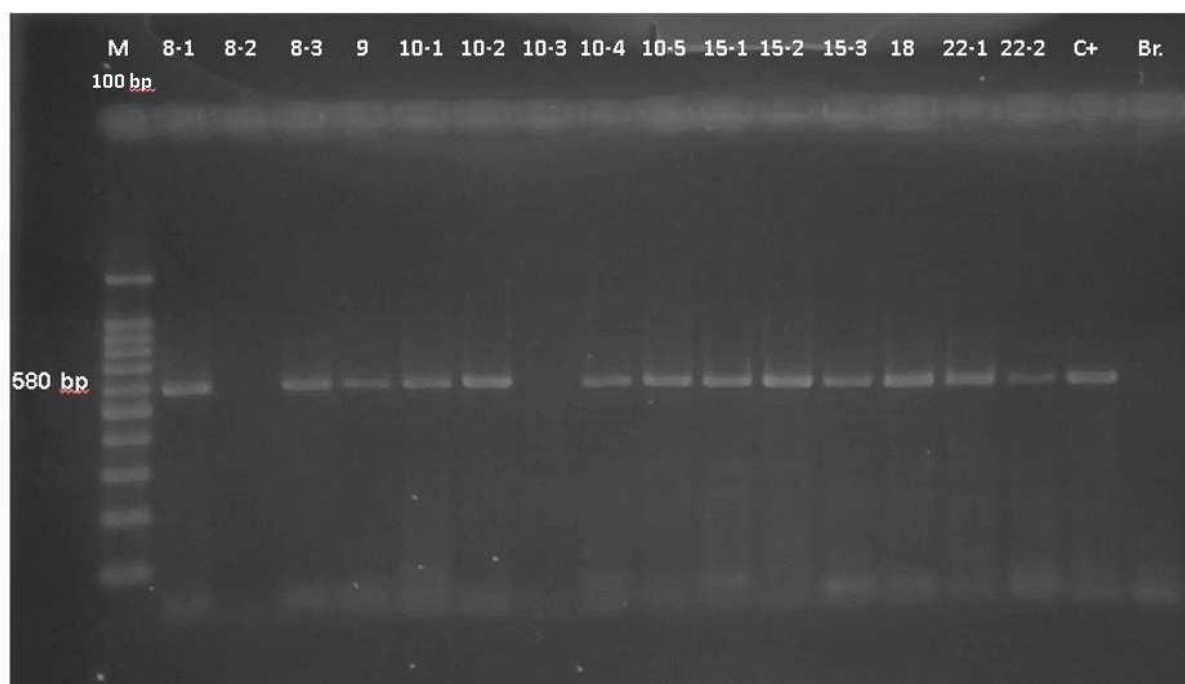
Nos testes moleculares para detecção de *Plasmodium*, as 76 amostras de fezes de bugios foram negativas para *P. vivax* e *P. malariae* tanto na PCR em tempo real (18S rRNA) quanto na PCR para *cyt b* de *Plasmodium*.

### 10.3.4 Resultados dos testes moleculares com amostras de DNA dos conteúdos intestinais de besouros

Um total de 87 espécimes de besouros coletados no IBot foram dissecados para retirada do conteúdo intestinal. Cada conteúdo foi submetido individualmente à extração de DNA.

Foi realizado o teste de identificação de *cyt b* de bugio nas amostras de 87 intestinos de besouros Scarabaeinae. Destas, 67 foram positivas para *cyt b* de bugio, ou seja, 77% confirmou a presença do DNA do *Alouatta guariba clamitans* no conteúdo intestinal dos besouros.

Na figura 27 estão demonstradas algumas amostras de fezes positivas para *cyt b* de *Alouatta*.



**Figura 27-** Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR para amplificar o fragmento do gene de *cyt b* de *Alouatta g. clamitans* em conteúdo intestinal de besouro. Amostras positivas (580 bp), controle positivo de sangue de bugio (DEPAVE/PMSP) (*Alouatta guariba clamitans*) e controle negativo (“mix” com todos os reagentes menos amostra de DNA).

Foi realizada a comparação entre as observações das quantidades de conteúdo fecal dos exemplares de cada espécie de besouro e os resultados do teste de *cyt b* de *Alouatta* (Tabela 18).

Foi possível verificar que 77% dos besouros que apresentaram conteúdo fecal foram positivos para o teste de *cyt b* de *Alouatta*, em destaque as espécies *Onthophagus haematopus*, *Uroxys terminalis* e *Onthophagus tristis*, que apresentaram concordância com a maioria de seus exemplares. Todos os besouros foram positivos para a presença de fezes no intestino e 23% negativos para a detecção do *cyt b* de *Alouatta guariba clamitans*.



**Tabela 18- Comparação entre resultados da avaliação da quantidade de conteúdo intestinal e do teste para detecção de *cyt b* de *Alouatta guariba clamitans* nos besouros coletados no IBot**

Espécie	N. besouros comparados	Conteúdo fecal (Con) / <i>Cyt b</i>			
		Con+/Cyt b+	Con+/Cyt b-	Con-/Cyt b+	Cont-/Cyt b-
<i>Onthophagus haematopus</i> (72)	72	53	19	0	0
<i>Uroxys terminalis</i> (9)	9	9	0	0	0
<i>Canthidium aterrimum</i> (4)	4	3	1	0	0
<i>Onthophagus tristis</i> (2)	2	2	0	0	0
<b>Total (87)</b>	<b>87</b>	<b>67 (77%)</b>	<b>20 (23%)</b>	<b>0 (0,0%)</b>	<b>0 (0,0%)</b>

Os besouros que apresentaram resultados positivos para conteúdo fecal e foram negativos para *cyt b* de *Alouatta* foram em menor número (23%), possivelmente tinham em seus intestinos fezes de outros animais.

As 87 amostras de DNA de conteúdo fecal de besouros foram testadas quanto a presença de DNA de *Plasmodium* na PCR em tempo real (18S), sendo que os resultados positivos foram confirmados em duas reações subsequentes. As amostras foram testadas também na Nested- PCR para detecção de *cyt b* de *Plasmodium*. Os resultados comparados estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19- Resultados dos testes moleculares com as amostras de conteúdo intestinal dos besouros coletados nas fezes de *Alouatta guariba clamitans* no IBot**

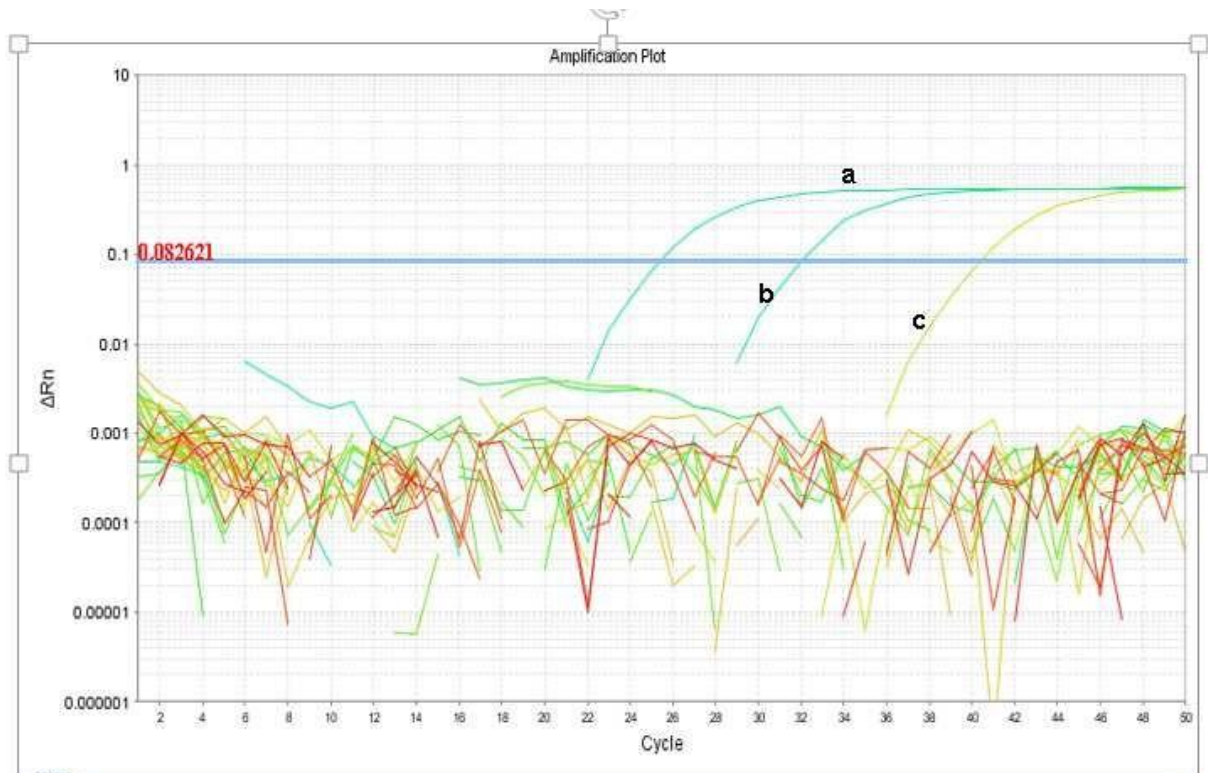
Espécie	N	Testes moleculares				Sequenc.
		<i>cyt b</i> <i>Alouatta</i>	18S <i>Ps/Pv</i>	18S <i>Pb/Pm</i>	<i>cyt b Plasm</i>	
<i>Onthophagus haematopus</i>	72	53 (73,6%)	1 (1,4%)	0 (0,0%)	3 (4,1%)	0 (0,0%)
<i>Uroxys terminalis</i>	09	09 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Canthidium aterrimum</i>	04	03 (75%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Onthophagus tristis</i>	02	02 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1(50,0%)	0 (0,0%)
<b>Total</b>	<b>87</b>	<b>67 (77%)</b>	<b>1 (1,4%)</b>	<b>0 (0,0%)</b>	<b>4 (4,6%)</b>	<b>0 (0,0%)</b>

*Ps/Pv* – *P. simium*/*P. vivax*,

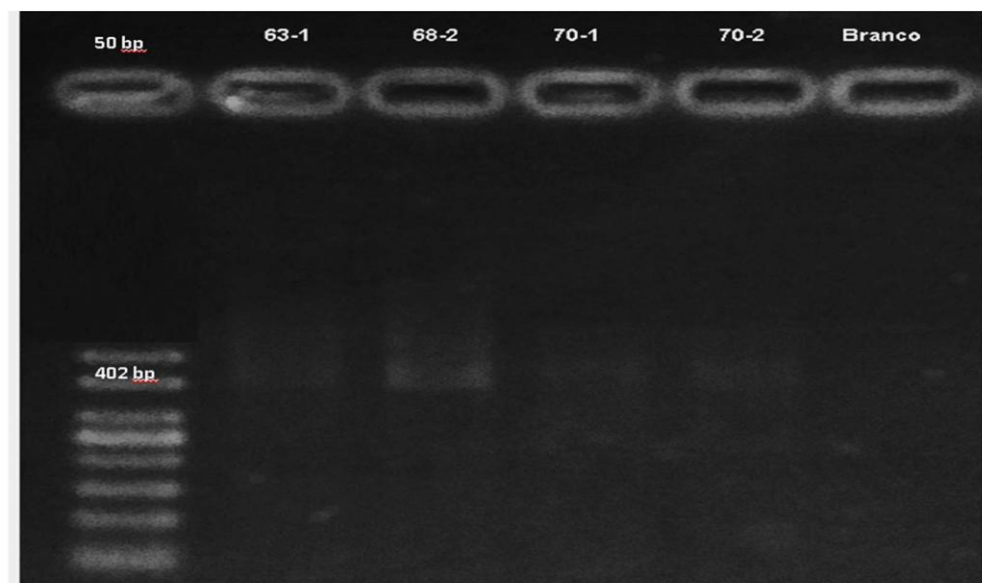
*Pb/Pm* – *P. brasilianum*/*P. malariae*

Foram detectados DNA de *Plasmodium* em 05 conteúdos intestinais de besouro (5/87- 5,7%), sendo que uma amostra foi positiva na PCR em tempo real (18S rRNA), gráfico 11 e as outras quatro amostras foram positivas no *cyt b* de *Plasmodium*, figura 28. Também foram submetidas à reação de sequenciamento, porém a baixa qualidade das sequências não permitiu a identificação da espécie do plasmódio. O besouro encontrado em maior frequência e também com resultados positivos para detecção de *Plasmodium* foi *Onthophagus haematopus* (72) ou seja, (4/72) 4,6% foram positivos para DNA de plasmódio.

No gráfico 16 está demonstrada a amostra de conteúdo intestinal de 1 besouro do IBot que foi positivo para *P. vivax* no teste (18S rRNA).



**Gráfico 16- PCR em tempo real para amplificação de fragmento do gene 18S rRNA de *Plasmodium vivax/simium* em uma amostra de conteúdo intestinal de besouro do IBot e um controle negativo. As duas curvas (a, b) representam o controle positivo de *Plasmodium vivax*. A curva (c) representa a amostra (49) de conteúdo intestinal de besouro positiva.**



**Figura 28- Eletroforese em gel de agarose a 2%, PCR para amplificar o fragmento do gene de cyt b de *Plasmodium* em conteúdo intestinal de besouro do IBot. As amostras 63-1, 68-2, 70-1 e 70-2 do conteúdo intestinal de besouro apresentaram o fragmento positivo.**

### 10.3.5 Resultados comparativos das amostras de fezes e besouros positivas para *Plasmodium*, coletadas no IBot

Foram feitas observações durante a coleta de fezes sobre o frescor das amostras no momento da coleta. Dentre as 76 amostras coletadas 68 estavam frescas (89,5%).

Foi observado que a maioria dos resultados positivos de conteúdo intestinal de besouro para plasmódio ocorreu dentre as amostras de fezes frescas, ou seja, 6,5% das amostras (5/76), tabela 20.

**Tabela 20- Características das amostras de fezes consumidas pelos besouros coprófagos que foram positivos para plasmódio no IBot**

<b>Amostras de fezes</b>	<b>Característica</b>
49	Fresca
63-1	Fresca
68-2	Fresca
70-1	Fresca
70-2	Fresca

### 10.3.6 Teste de sangue oculto nas amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans* do IBot (Teste Rápido Imunocromatográfico)

As 76 amostras de fezes de bugios do IBot testadas para presença de sangue oculto foram negativas.

## DISCUSSÃO:

Neste estudo, foi possível detectar a presença de *P. simium*/*P. vivax* em amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans* e intestino de besouros coprófagos coletados na área da Cantareira por meio de análises moleculares. E nos anos 1960, Deane *et al.*<sup>28</sup>, descreveu um caso de malária por *P. simium* contraído por um guarda florestal durante coleta entomológica nessa mesma área.

Macacos do gênero *Alouatta* foram frequentemente infectados pelos plasmódios *P. simium*, *P. vivax* e *P. brasilianum*, *P. malariae*, de acordo com pesquisas realizadas por Deane<sup>24</sup>. No PEC/PEAL, a PCR para identificação de *cyt b* foi utilizada para verificar a presença de DNA de *Alouatta guariba clamitans* nas fezes coletadas no solo, sendo que 51% dessas amostras confirmaram a presença de DNA de bugio. Quanto às amostras de fezes contidas no conteúdo intestinal dos besouros, 64,3% deles (item 10.2.2), apresentaram DNA desse primata.

No que diz respeito à quantidade de fezes contidas no interior do intestino de besouros do PEC/PEAL, 75% deles apresentaram o órgão repleto de fezes (tabela 8). A análise estatística desse dado demonstrou que existe maior chance de detectar *cyt b* de *Alouatta* em besouros com o intestino repleto de fezes (gráfico 9). Nessa mesma área, as fezes de bugio tiveram uma positividade de 2,7% para *P. brasilianum*/*P. malariae* por PCR em tempo real, enquanto *P. simium*/*P. vivax* atingiu um percentual de 0,7%. Já para as amostras de conteúdo intestinal de besouro, o *P. brasilianum*/*P. malariae* e *P. simium*/*P. vivax*, tiveram positividade de 2,8% e de 2,1%, respectivamente.

Na outra localidade de estudo (IBot), 60% das fezes coletadas foram positivas quanto à presença de *cyt b* de bugio, sendo que 79% dos besouros aí coletados, estavam com o intestino repleto de fezes (tabela 17). Destes, 77% apresentaram DNA de bugio (item 10.3.4). Nesta área, não foi detectado DNA de plasmódio em amostras de fezes de bugios, porém no conteúdo intestinal de besouro, foi possível detectar uma amostra positiva (1%) para *P. simium*/*P. vivax*.

Tais resultados confirmaram a presença de *Alouatta guariba clamitans* nas áreas de estudo por meio da PCR para identificação do DNA do hospedeiro nas fezes coletadas no solo e do conteúdo fecal no intestino de besouros e corroboram com um estudo semelhante realizado na Índia, onde 50% das amostras de fezes coletadas de cinco espécies de primatas não humanos, continham *cyt b* proveniente de cada uma das espécies de símios encontradas localmente<sup>52</sup>.

Para a conservação das fezes e besouros coletados nas áreas de estudo, foram utilizados *RNA later* e álcool 70%, sendo que a utilização do álcool apresentou bons resultados, assim como na pesquisa de Siregar *et al.*<sup>49</sup>.

No que diz respeito ao frescor das fezes de bugios coletadas no PEC/PEAL e IBot, verificou-se que as fezes consumidas pelos besouros na maioria das vezes estavam frescas, indicando que essa característica pode propiciar um forrageamento mais eficaz desses besouros, visto que a emissão de compostos voláteis presentes nas fezes mais umedecidas, podem contribuir para que as células olfativas localizadas nas antenas dos besouros, captem e selecionem as fezes presentes no campo<sup>70,96,97</sup>.

Porém, de acordo com a análise estatística, não foi possível afirmar com base nas amostras analisadas, que *cyt b* de *Alouatta* tenha maior probabilidade de ser detectado em fezes frescas (gráfico 13). Desta forma, o encontro de amostras positivas para *cyt b* de *Plasmodium* também não está relacionado ao frescor das fezes (gráfico 14), diferentemente de estudo realizado por Boundenga *et al.*<sup>98</sup>, que encontraram relação estatisticamente significativa entre amostras positivas para *cyt b* de plasmódio e fezes frescas coletadas antes de completar 24 horas após a defecação dos bugios.

As amostras de intestino de besouro apresentaram um percentual mais expressivo para a detecção de *cyt b* de *Alouatta g. clamitans*, sugerindo que o “ambiente orgânico” no interior desse órgão possibilita maior integridade do DNA, protegendo-o de intempéries ambientais.

Quanto ao comportamento dos besouros coprófagos, estes procuram alimento realizando voos próximos ao solo ou ficando empoleirados nas folhas presentes na mata, aguardando a chegada dos primatas. Nas matas tropicais, algumas espécies podem ser competentes em forrageamento no dossel, podendo voar até 10 metros de altura, visto que é comum que fezes de aves ou mamíferos fiquem retidas nas árvores. Outras espécies podem ser foréticas, isto é, podem ser encontradas nos pelos de alguns mamíferos, incluindo primatas do gênero *Alouatta*<sup>74</sup>.

No período em que as coletas de besouros foram realizadas para este estudo, foi possível observar que alguns besouros ficavam empoleirados em folhas, próximos à presença dos bugios e de outros primatas. Alguns desses besouros coprófagos empoleirados foram coletados e dissecados, sendo que a análise da quantidade de conteúdo fecal demonstrou que a maioria deles estavam sem fezes em seus intestinos, indicando que besouros empoleirados não são indicados para o rastreamento de fezes de bugio e plasmódio.

Segundo Vaz-de-Mello, *et al.*<sup>74</sup>, estudo realizado em Viçosa/MG com *Canthon* (*Glaphyrocanthon*), demonstrou que esse besouro foi coletado em armadilha com isca de fezes humanas, colocada à 10 metros do solo, indicando sua capacidade de empoleiramento em elevadas altitudes.

Em uma outra pesquisa a autora comenta a partir de uma informação pessoal, que as espécies de besouros coprófagos mais atraídas por fezes de primatas na Mata Atlântica, *Canthon oliverioi* e *Canthon ibarragrassoi*, ambos do subgênero *Glaphyrocanthon*, não foram coletados sendo que era esperado o encontro dos mesmos pois ocorreu a reintrodução de *Alouatta g. clamitans*<sup>94, 101</sup>. Nesta pesquisa uma dessas espécies de besouro foi coletada e identificada.

No estudo de Jacobs *et al.*<sup>80</sup> o besouro *Canthon* (*Glaphyrocanthon*) *quadriguttatus* foi encontrado realizando foresia nos pelos de macacos da Amazônia ou forrageando junto aos bandos de macacos. E no trabalho de Korasaki *et al.*<sup>100</sup> esse besouro também foi coletado, porém em *pitfall* iscada com fezes humanas.

No presente trabalho, as espécies *Canthon* (*Glaphyrocanthon*) *aff. coloratus* e *Canthon* (*Glaphyrocanthon*) *aff. ibarragrassoi* foram coletadas no PEC, sendo que o *Canthon aff. ibarragrassoi*, foi um dos mais coletados nessa localidade (área preservada), sendo positivo para a detecção do plasmódio à partir do DNA de fezes extraídas do seu intestino por PCR em tempo real (18 S rRNA) e PCR mitocondrial (*cyt b*).

As análises estatísticas indicaram que a espécie *Canthon aff. ibarragrassoi* apresentou mais positivos para *cyt b* de *Alouatta*, sugerindo que esta espécie seja a mais associada às fezes de bugios em comparação às demais (gráfico 8) e maior associação dessa espécie com ambientes mais preservados (gráfico 5).

O besouro *Onthophagus haematopus* esteve presente em todas as áreas de estudo (PEC, PEAL e IBot), tendo sido a espécie mais coletada. A partir do DNA de fezes extraídas do intestino de dois exemplares dessa espécie, foi possível detectar a presença de plasmódio por PCR em tempo real (18 S rRNA) e PCR mitocondrial (*cyt b*) e fazer o sequenciamento do DNA de *P. simium*.

O gênero *Onthophagus* é um dos mais comuns entre os besouros coprófagos, sendo cosmopolita e possuindo aproximadamente 2000 espécies descritas. *Onthophagus aff. haematopus* foi coletado em armadilha *pitfall* iscada com fezes humanas em floresta primária do município de Benjamim Constant/AM<sup>100</sup>. Essa mesma espécie de besouro foi coletada na

pesquisa referida acima, em área de reintrodução de *Alouatta guariba clamitans* no Parque Nacional da Tijuca/RJ<sup>94</sup>.

De acordo com as pesquisas citadas e os resultados desse trabalho é possível inferir que o besouro da espécie *Onthophagus haematopus* está associado às fezes de bugios tanto em áreas preservadas quanto em áreas degradadas. As espécies *Onthophagus haematopus* e *Canthon aff. Ibarragrassoi* foram coletadas com maior frequência nas fezes dos bugios.

Amostras de fezes de *Alouatta guariba clamitans* com besouros coletadas no IBot não foram positivas nas técnicas de PCR, contudo, a eficácia do método para rastrear DNA de *Plasmodium* a partir das fezes de bugios, já foi comprovada em estudo realizado no projeto FAPESP 2014/10.919-4, coordenado pela Dra. Ana Maria Duarte. Na pesquisa à qual o presente trabalho está vinculado, amostras de fezes coletadas em período anterior (2015) apresentaram positividade para *P. simium/P. vivax* (FAPESP 2014/10.919-4) (dados não publicados). Os resultados de pesquisas semelhantes corroboram com os dados aqui apresentados, pois sugerem que o DNA de plasmódio detectado nas fezes tem sua origem no fígado, chegando no intestino do bugio pela via biliar<sup>45,49,53-56</sup>.

A fim de procurar elucidar a “via de condução” do DNA de plasmódio em bugios, foram realizados os testes para pesquisa de sangue oculto nas fezes coletadas. Os resultados foram negativos para as fezes coletadas do IBot e positivos para 4 amostras de fezes de bugios da Cantareira, contudo, estas foram negativas quanto à presença de DNA de plasmódios. Isso sugere que o DNA do parasita seja oriundo do fígado/via biliar, como referido acima.

Os resultados obtidos com as amostras de intestino de besouro do PEC/PEAL positivas para DNA de *Plasmodium* apresentaram maior percentual do que àquelas provenientes das fezes de bugios, sugerindo que a microbiota desses coleópteros contribui para a maior preservação do DNA do plasmódio ou que o mesmo possa ter se alimentado de outras amostras de fezes que não foram coletadas.

No PEC/PEAL o besouro *Canthon (Glaphyrocannon) aff. ibarragrassoi* foi 80% positivo para *cyt b* de *Alouatta g. clamitans* e no IBot o espécime *Onthophagus haematopus*, foi positivo 74%, indicando que estes coleópteros realizaram forrageamento diretamente nas fezes dos bugios.

Foram apresentadas diferenças significativas entre as duas áreas de estudo, uma vez que o PEC/PEAL há muito tempo se apresenta como sendo uma área propícia para a aplicação de técnicas de rastreamento de plasmódios e hospedeiros símios propostas neste estudo. Porém, atualmente não sabemos como será a recomposição das populações de



*Alouatta* e dos besouros coprófagos que foram atingidas pela epizootia de febre amarela, sendo impossível prever neste momento como será a dinâmica dos plasmódios e de seus reservatórios símios.

Quanto ao IBot, não foi realizada a análise estatística, pois verificamos que há necessidade de realizar um esforço maior de coletas tanto de fezes de bugios quanto de besouros coprófagos e de anofelinos, visto que pouco se sabe sobre esses vetores localmente, tendo sido encontrados em uma pesquisa realizada apenas espécies de anofelinos auxiliares<sup>93</sup>.

Devido à febre amarela (2017-2018) que praticamente dizimou a população de bugios do PEC/PEAL, este estudo toma posição de destaque por ter sido realizado num momento anterior a essa epizootia. E neste momento, não é possível prever os desdobramentos de tal impacto sobre a biodiversidade no PEC/PEAL e o ciclo de transmissão de plasmódios nessa área. No IBot também foi detectada a presença desse parasita em símios e besouros e será necessário envidar mais esforços, a fim de obter um maior número de amostras de fezes de símios, besouros e mosquitos vetores.

## 12 CONCLUSÕES

A- Os testes moleculares empregados foram satisfatórios para o rastreamento de DNA do hospedeiro e de plasmódios nas amostras de fezes e no conteúdo intestinal dos besouros coprófagos coletados nas áreas de estudo, sendo o uso dessa metodologia não invasiva, uma importante ferramenta para promover a ampliação de pesquisas com símios em outras localidades de interesse.

B- A espécie de besouro *Canthon (Glaphyrocanton) aff. ibarragrassoi* apresentou o maior número de exemplares coletados em área preservada (PEC) e de positivos para *cyt b* de *Alouatta*. Já *Onthophagus haematopus* foi a espécie com maior ocorrência tanto em ambiente preservado como degradado no PEC/PEAL e IBot, sendo que no conteúdo intestinal de dois exemplares dessa espécie, foi possível obter duas amostras sequenciadas e identificadas como *Plasmodium simium*. Essas espécies de besouros citadas, podem ser consideradas como fontes de detecção de plasmódios em fezes de bugios da Mata Atlântica.

C- No PEC/PEAL as fezes de bugio foram positivas para *P. brasilianum/P.malariae* e *P. simium/P.vivax* e as amostras de conteúdo intestinal de besouro apresentaram *P.brasilianum/P.malariae* e *P.simium/P.vivax*. No IBot, não foi detectado DNA de plasmódio em amostras de fezes de bugios. No conteúdo intestinal de besouro, foi possível detectar uma amostra positiva para *P.simium/P.vivax*.

D- No IBot, os testes para pesquisa de sangue oculto nas fezes de bugios foram negativos. E no PEC/PEAL foram positivos para 4 amostras, estas foram negativas quanto à presença de DNA de plasmódios. Nesse estudo, o DNA do parasita é oriundo do fígado/via biliar.

E- Em áreas florestadas, onde exista dificuldade quanto ao rastreamento e à confirmação da presença de símios, as técnicas empregadas no estudo poderão ser utilizadas e adaptadas para a detecção de DNA de outros hospedeiros primatas não humanos em fezes e em besouros coprófagos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Forattini O P. Culicidologia médica. São Paulo: EDUSP; 2002.
2. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 3ª ed. Brasília; 2019
3. Rey L. Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
4. Organização Pan-Americana da Saúde. Malária [acessado em 01 novembro de 2019]. Disponível:[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875)
5. Cimerman B. Atlas de Parasitologia: Artrópodes, Protozoários e Helminhos. 10ªed. São Paulo: Atheneu; 2002.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Ciclo de vida plasmódio [citado 2019 jul 17]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
7. Superintendência de Controle de Endemias [citado 2019 nov 05]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-deendemias/programas/malaria/doenca>
8. Ministério da Saúde, [citado 2019 out 14]. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-az/malaria>
9. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Dados estatísticos da malária no estado de São Paulo [citado 2019 dez 03]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cvecentro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/oldzoonoses/malaria/dadosestatisticos>.

10. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Mal J.* 2010; 9: 115.
11. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11: 623-39.
12. De Pina-Costa A. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:618–63.
13. Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RM, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia de malária vivax no foco Aldeia dos índios, município de Peruíbe, Estado de São Paulo, 1984 a 1986. *Cad Saúde Pública* 1988; 4: 276-92.
14. Curado I, Duarte AM, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997.92: 235-43
15. Curado I, Malafronte RS, Duarte AM, Kirchgatter K, Branquinho MS, Galati EA. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Trop.* 2006;100:54.62
16. Cerutti Jr C, Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007. 228.
17. Maselli LM, Levy D, Laporta GZ, Monteiro AM, Fukuya LA, Ferreira-da-Cruz MF, *et al.* Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in nonendemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. *Malaria J.* 2014. 13:224
18. Duarte AM. Estudo de malária em macacos silvestres brasileiros [dissertação]. São Paulo:

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1998.

19. Yamasaki T, Duarte AM, Curado I, Summa Mel, Neves DV, Wunderlich G, *et al.* Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol.* 2011; 40: 392-400.
20. Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Bianco Junior C, Silva S, *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health.* 2017: 1038-46.
21. Martinelli A, Culleton R. Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory. *Parasitology.* 2018 145(1): 41-54.
22. Collins WE. Major animal models in malária research: simian. In: *Principles and Practices of Malariology.* Edinburgh: Churchill Livingstone; 1988, p.1473-501.
23. Duarte AM, Gomes AC. Aspectos epidemiológicos da malária humana e simiana em área de influência do reservatório da usina hidrelétrica de Porto Primavera, Município de Presidente Epitácio [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2003.150.
24. Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87 Suppl. III: 1-20.
25. Fonseca F. Plasmódio de Primata do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1951; 49: 543-51.
26. Deane LM, Ferreira Neto JA, Encontro do *Plasmodium brasilianum* em macacos do Território Federal do Amapá, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1969. 11: 199-202.
27. Deane LM, Ferreira Neto JA, Okumura M, Ferreira MO. Malaria parasites of Brazilian monkeys. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1969; 11:71.86.

28. Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto JA. Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. Bull World Health Organ. 1966; 35(5): 805-8.
29. Lal A A, De La Cruz V F, Collins W E, Campbell G H, Procell, P M, McCutchan T F. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? J Biol Chem. 1988; 263:5495-8.
30. Lal AA, De la Cruz V F, Campbell G H, Procell P M, Collins W E, McCutchan T F. Structure of the circumsporozoite gene of *Plasmodium malariae*. Mol. Biochem. Parasitol. 1988b; 30: 291-4.
31. Goldman I F, Qari S H, Millet P G, Collins W E, LAL A A. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. Mol. Biochem. Parasitol. 1993; 57: 177-80.
32. Escalante A A, Barrio E, Ayala F J. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. Mol. Biol. Evol. 1995; 12:616–26.
33. Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria based on the gene encoding cytochrome *b* from the linear mitochondrial genome. Prot Natl Acad. 1998; 95: 8124-29
34. Fandeur T, Volney B, Peneau C, de Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. Parasitology. 2000; 120:11–21
35. Li C, Seixas E, Langhorne J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. Med Microbiol Immunol. 2001; 115-26.
36. Tazi L, Ayala F J, Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P.*

*simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 2011; 11:209–21.

37. Arruda M E, Nardin E H, Nussenzweig R S, Cochrane A H. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 41: 379-85.
38. Volney B, Pouliquen J-F, De Thoisy B, Fandeur T A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. Acta Trop. 2002; 82:11–23.
39. Duarte A M, Porto M A, Curado I, Malafronte R S, Hoffman E H, Oliveira S G, *et al.* Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. J. Med. Primatol. 2006; 35: 87-96.
40. Duarte AM, Malafronte RS, Cerutti C Jr, Curado I, Paiva B R, Maeda AY, *et al.* Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? Acta Trop. 2008; 107: 179-85.
41. Rachou RG. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoradas de malária. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. 1958; 10: 145–81
42. Deane L M, Deane M P, Ferreira Neto JA, Barbosa A F. On the transmission of simian malaria in Brazil. Rev Inst Med Trop. 1971;13:311-19.
43. Barnes M A, Turner C R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. Conservation Genetics. 2016; 17:1–17.

44. Bohmann K, Evans A, Gilbert MT, *et al.* Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol Evol.* 2014; 29:358–67.
45. Kawai S, Sato M, Kato-Hayashi N, Kishi H, Huffman M A, Maeno Y, *et al.* Detection of *Plasmodium knowlesi* DNA in the urine and feces of a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. *Mal J.* 2014; 13-373.
46. Buppan P, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Mal J.* 2010; 9-72.
47. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala F J, Arnathau C, *et al.* African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 1458-63.
48. De Nys HM, Calvignac-Spencer S, Thiesen U, Boesch C, Wittig RM, Mundry R, Leendertz FH. Age-related effects on malaria parasite infection in wild chimpanzees. *Biol Lett.* 2013; 9(4):1160.
49. Siregar JE, Faust CL, Murdiyarso LS, Rosmanah L, Saepuloh U, Dobson A P, *et al.* Noninvasive surveillance for *Plasmodium* in reservoir macaque species. *Mal J.* 2015; 14-404.
50. Mapua MI, Qablan MA, Pomajbíková K, Petrželková KJ, Hůzová Z, Rádrová J, *et al.* Ecology of malaria infections in western lowland gorillas inhabiting Dzanga Sangha Protected Areas Central African Republic. *Parasitology.* 2015; 890-900.
51. Liu W, Sundararaman SA, Loy DE, Learn GH, Li Y, Plenderleith LJ, *et al.* Multigenomic Delineation of *Plasmodium* Species of the *Laverania* Subgenus Infecting Wild-Living Chimpanzees and Gorillas. *Genome Biol Evol.* 2016; 1929-39.



52. Dixit J, Zachariah A, PKS, Chandramohan B, Shanmuganatham V, Karanth KP. Reinvestigating the status of malaria parasite (*Plasmodium sp.*) in Indian non-human primates. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12 (12).
53. Jirku M, Pomajbíková K, Petrzelková KJ, Huzová Z, Modry D, Lukes J. Detection of *Plasmodium* spp. in human feces. Emerg Infect Dis. 2012; 634-36.
54. Liu W, Li Y, Shaw KS, Learn GH, Pleanderleith LJ, Malenke JA, *et al.* African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. Nat Commun. 2014; 5: 3346.
55. Assis G M P, Alvarenga D A M, Costa D C, Junior J C, Hirano Z M, Kano F S, *et al.* Detection of Plasmodium in faeces of the New World primate *Alouatta clamitans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2016; 570-76.
56. Abkallo HM, Liu W, Hokama S, Ferreira PE, Nakazawa S, Maeno Y, *et al.* DNA from preerythrocytic stage malaria parasites is detectable by PCR in the feces and blood of hosts. Int J Parasitol. 2014; 467-73.
57. Reis N R, Peracchi A L, Pedro W A, Lima I P. Mamíferos do Brasil. Londrina, 2006.
58. Almeida A F, Vasconcelos M K. Fauna Silvestre: Quem são e onde vivem os animais na metrópole paulistana. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, 2007.
59. Departamento de parques e áreas verdes. Manejo e Conservação do Bugio *Alouatta clamitans* na Região Metropolitana de São Paulo. São Paulo, 2009.
60. Bicca-Marques J. C, Freitas D. S. The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: Protecting howler monkeys is a matter of public health. Trop Cons Sci. 2010; 3:78-89.

61. International Union for Conservation of Nature. Distribuição geográfica da espécie *Alouatta guariba clamitans* [citado 2019 out 14]. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/39916/10284881>
62. Fioravanti C. O alarme dos macacos. Rev. Fapesp. 2018; 263:18-23.
63. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Boletim de febre amarela [citado 2019 nov 05]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-detransmissao-porvetores-e-zoonoses/agrivos/febre-amarela/boletim-epidemiologico>
64. Cunha M S, Da Costa A C, De Azevedo F N, Guerra J M, Dos Santos FC, Nogueira J S, *et al.* Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016-2017). Scien. Rep. 2019; 9:5474.
65. Lapenta, M J. Frugivoria, Dispersão Primária e Secundária de Sementes Consumidas por Micos-Leões-Dourados (*Leontopithecus rosalia*) na Reserva Biológica União, RJ. [tese] São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2007.
66. Ribeiro A P, Port-Carvalho M, Aguiar O T de, Sarzi I. Avaliação do potencial de bugios (*Alouatta clamitans*, Cabrera, 1940) (Primates: Atelidae) como dispersores de sementes no Parque Estadual da Cantareira. IF Sér. Reg. 2007; 31: 147-51.
67. Hanski I, Cambefort Y. Dung Beetle Ecology. Princeton: University Press; 1991
68. Arnett RH Jr, Thomas MC, Skelley P E, Frank J H (eds.), American Beetles, Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionidae. Boca Raton: CRC Press LLC, 2002.

69. Scholtz C H, Grebennikov V V. Scarabaeiformia: Handbook of Zoology. Arthropoda, Insecta. In Beutel R G, Leschen A B (eds.), Handbook of zoology. New York: Walter de Gruyter. 2005.p.345-25.
70. Simmons L W, Ridsdill-Smith T J. Ecology and evolution of dung beetles. Blackwell Publishing, Oxford; 2011. 347 p.
71. Vaz-de-Mello F Z, Estado Atual de conhecimentos dos Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) do Brasil. PrIBES.2000; 183-95.
72. Montgomery G G, Sunquist M E. Impact of sloths on neotropical energy flow and nutrient cycling. In Goley F B, Medina E (eds.), In Tropical ecological systems. New York: SpringerVerlag. 1975. p. 69-98.
73. Halffter, G. & Matthews, E.G. The natural history of dung beetles of the subfamily Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae), Folia Entomologica Mexicana; 1966. 12/14: 1–312
74. Vaz-de-Mello F Z, Louzada J N C. Considerações sobre forrageio arbóreo por Scarabaeidae (Coleoptera, Scarabaeoidea), e dados sobre sua ocorrência em floresta tropical do Brasil. Acta Zoologica Mexicana, 1997; 72: 55-61.
75. Oliveira V H F, Souza J G M, Vaz-de-Mello F Z, Neves FS, Fagundes M. Variação na fauna de besouros rola-bosta (Coleoptera: Scarabaeinae) entre habitats de cerrado, mata seca e mata ciliar em uma região de transição Cerrado-Caatinga no norte de Minas Gerais MG. Biota, 2011; p. 416.
76. Flechtmann C A H, Rodrigues S R, Couto H T Z. Controle biológico da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans irritans*) em Selvíria, Mato Grosso do Sul. 4. Comparação entre métodos de coleta de besouros coprófagos (Scarabaeidae). Rev. Bras. Entomol, 1995b; 39: 259-76.

77. Marchiori CH, Oliveira AT, Linhares AX, Artrópodes associados a massas fecais bovinas no sul do Estado de Goiás. *Neotrop. Entomol*, 2001; 19-24.
78. Noriega JA. Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) attracted to *Lagothrix lagotricha* (Humboldt) and *Alouatta seniculus* (Linnaeus) (Primates: Atelidae) dung in a Colombian Amazon Forest. *Psyche*, 2012.
79. Estrada A, Halfpeter G, Coates-estrada R, Meritt Jr D A. Dung beetles attracted to mammalian herbivore (*Alouatta palliata*) and omnivore (*Nasua narica*) dung in the tropical rainforest of Los Tuxtlas Mexico. *J. Trop. Ecol*, 1993; 9: 45–54.
80. Jacobs J, Nole I, Palminteri S, Ratcliffe B. First come, first serve: “Sit and wait” behavior in dung beetles at the source of primate dung. *Neotrop. Entomol*. 2008; 37:641-45.
81. Montes J. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 2005; 39:578-84.
82. Culot L, Pereira L A, Agostini I, Almeida M A, Alves R S, Aximoff I, *et al.* Atlantic-Primates: A dataset of communities and occurrences of primates in the Atlantic Forests of South America. *Ecology*. In Press. Crossref, PubMed, Google Scholar. 2018
83. Clerici, Giannina Piatto. Estimativa da abundância, densidade populacional e composição sexoetária de *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940 (Primates: Atelidae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga [Relatório Final de Aprimoramento]. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; 2019. 1-26.
84. Consoli R A G B, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994. 225 p.

85. Gómez A, Kolokotronis SO. Genetic identification of mammalian meal source in dung beetle gut contents, Mitochondrial DNA Part A.2016; 28:612-15.
86. Vaz-de-Mello F Z, Edmonds W D, Ocampo F, Schoolmeesters P. A multilingual key to the genera and subgenera of the subfamily Scarabaeinae of the New World. Zootaxa. 2011; 2854:1-73.
87. Bickersmith S A, Lainhart W, Moreno M, Chu V M, Vinetz J M, Conn J E. A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110: 573-76.
88. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson H P, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5636-43.
89. Basic Local Alignment Search Tool. BLAST [citado 2019 dez 04]. Disponível em: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
90. Thompson, J.D. *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673–80.
91. Stamatakis A. Raxml version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014; 30: 1312–13.
92. Cipres [citado 2019 nov 04]. Disponível em: <https://www.phylo.org/portal2/login!input.action#>

93. Chagas C R F. *Plasmodium* spp. em aves silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo: identificação de espécies por microscopia e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b. [Tese] Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
94. Genes L, Fernandez F A, 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*. 2018; 33(1): 88-98.
95. MeioambienteSP. Parque Estadual da Cantareira [citado 2019 nov 20]. Disponível em: <http://www.saopaulo.sp.gov.br/conhecasp/parques-e-reservas-naturais/parque-estadual-dacantareira/>
96. Dormont L, Rapior S, Mckey D B. & Lumaret J P. Influence of dung volatiles on the process of resource selection by coprophagous beetles. *Chemoecology*. 2007; 17: 23–30.
97. Halffter G, Matthews E G. The natural history of dung beetles. A supplement on associated biota. *La Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 1971; 13: 147–63.
98. Boundenga L, Ollomo B, Rougeron V, Mouele L Y, Mve-Ondo B, Delicat-Loembet, L M, Prugnolle, F. Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon. *Mal J*. 2015; 1-8.
99. Cambefort, Y. Nidification behaviour of Old World Oniticellini (Coleoptera: Scarabaeidae). In G. Halffter and W. Edmonds (eds.) *The nesting behaviour of dung beetles (Scarabaeinae): an ecological and evolutive approach*. Mexico: Instituto de Ecologia, 1982. p. 139–43.
100. Korasaki V, Vaz-de-Mello F Z, Braga R F, Zanetti R, Louzada J, Taxocenose de Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae) em Benjamim Constant, AM. *Acta Amazônica*. 2012; 423 –32.

101. Catalogueoflife. *Canthon ibarragrassoi* [citado 2019 nov 28]. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2019/search/all/key/Canthon+ibarragrassoi/fossil/1/match/1>
102. Halfpeter, G. & Edmonds, W.D. The nesting behavior of dung beetles (Scarabaeinae): An ecological and evolutionary approach. México: Man and the Biosphere Program UNESCO, 1982. p.177.
103. Ciclo de vida do plasmódio [citado 2020 fev. 26]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
104. Dados relacionados com os casos autóctones na região Extra-Amazônica *P. vivax* [citado 2019 dez 03]. Disponível em: [https://public.tableau.com/profile/malaria.brasil#!/vizhome/Boletim\\_regiaoExtraAmazonica\\_2019\\_30\\_09\\_2019/SerieHistorica](https://public.tableau.com/profile/malaria.brasil#!/vizhome/Boletim_regiaoExtraAmazonica_2019_30_09_2019/SerieHistorica)
105. Google Earth Pro PEC e PEAL [citado 2020 mar 10]. Disponível em: <https://www.google.com.br/earth>
106. Google Earth Pro IBot [citado 2020 mar 10]. Disponível em: <https://www.google.com.br/earth>
107. MeioambienteSP. Parque Estadual da Cantareira [citado 2019 dez 05]. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/instituto-de-botanica/>
108. Holter P, Scholtz CH, Wardhaugh KG. Dung feeding in adult scarabaeines (tunnellers and endocoprids): even large dung beetles eat small particles. *Ecol Entomol.* 2002;27:169–76.

# ANEXOS

## Anexo 1



PROCESSO SMA N.º  
INTERESSADO  
ASSUNTO

EQUIPE

VIGÊNCIA

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO FLORESTAL  
Rua do Horto, 931 - CEP 02377-000 - S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555  
[www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)  
: 260108 - 007.028/2017  
: Heitor Franco de Andrade Junior  
: Encaminha o projeto de pesquisa: "Detecção do *Plasmodium* spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e simia na Mata Atlântica"  
: Heitor Franco de Andrade Junior, Fabiana Santos Silva, Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Licia Natal Fernandes, Sônia Aparecida Casari, Juarez Fuhrmann, Izilda Curado, Iole Arumi Sei, Luis Filipe Mucci, Marcio Port Carvalho, Marina Sherer, Vladimir Arraes, Igor Lucoves Sicchi, Amanda Lumy Kawanami e Thais de Moura Coletti  
: Setembro de 2017 a Setembro de 2019

Carta COTEC n° 849/2017 D114/2017 Mp

São Paulo, 18 de outubro de 2017.

Senhor

Heitor Franco de Andrade Junior  
Avenida Manoel de Nobrega n° 959,  
Jardim Aldagisa, Osasco-SP  
CEP: : 06030-150  
Tel.: (11) 3061-7010  
E-mail: hfandrad@usp.com

Apraz-nos informar que o projeto "Detecção do *Plasmodium* spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e simia na Mata Atlântica", constante do processo em referência, de autoria de Heitor Franco de Andrade Junior, Fabiana Santos Silva, Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Licia Natal Fernandes, Sônia Aparecida Casari, Juarez Fuhrmann, Izilda Curado, Iole Arumi Sei, Luis Filipe Mucci, Marcio Port Carvalho, Marina Sherer, Vladimir Arraes, Igor Lucoves Sicchi, Amanda Lumy Kawanami e Thais de Moura Coletti, foi aprovado para ser executado, no período de Setembro de 2017 a Setembro de 2019, na seguinte Unidade:

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
Parque Estadual da Cantareira  Ao responsável pela Unidade  Gestor: Vladimir Arrais de Almeida	a) <u>Sede Administrativa:</u> Endereço: Rua do Horto, n° 1.799 Horto Florestal São Paulo-SP CEP: 02.377-000 Telefones para informação: (11) 2203-0115 E-mail: <a href="mailto:pe.cantareira@fflorestal.sp.gov.br">pe.cantareira@fflorestal.sp.gov.br</a> <a href="mailto:pec.cabucu@fflorestal.sp.gov.br">pec.cabucu@fflorestal.sp.gov.br</a> <a href="mailto:pec.engordador@fflorestal.sp.gov.br">pec.engordador@fflorestal.sp.gov.br</a> <a href="mailto:vladimir@fflorestal.sp.gov.br">vladimir@fflorestal.sp.gov.br</a>  Dias e horário de funcionamento: de segunda-feira a sexta-feira das 8h às 17h.  b) <u>Visitação:</u> Dias e horário de funcionamento: sábado, domingo e feriados, das 8h às 17h. O acesso às trilhas é permitido somente até às 15h. Ingresso: R\$ 9 (crianças até 12 anos, adultos com mais de 60 anos e pessoas com deficiência não pagam). Estudantes pagam meia-entrada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Com relação à realização do projeto no Parque Estadual da Cantareira, manifestamo-nos: <u>De acordo com a execução do projeto;</u></li> <li>• Com relação aos resultados do projeto, as informações geradas serão de: Alta prioridade;</li> <li>• Com relação ao planejamento da Unidade, o Parque Estadual da Cantareira possui: Plano de Manejo;</li> <li>• Com relação às atividades previstas pelo projeto: não existe restrição;</li> <li>• <u>As seguintes colocações devem ser observadas pelos autores, por ocasião da visita a esta Unidade:</u></li> <li>• Estamos de acordo com a execução do projeto apresentado;</li> <li>• As produções, tal como artigos, teses, demais produções científicas devem ter uma cópia encaminhada à gestão da Unidade;</li> <li>• <u>Pede-se que o cronograma com datas de saída a campo e coleta sejam enviados com antecedência para a equipe técnica;</u></li> <li>• Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque</li> </ul>





SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

INSTITUTO FLORESTAL

Rua do Horto, 931 - CEP 02377-000 - S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555  
[www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

PROCESSO SMA N.º  
INTERESSADO  
ASSUNTO

: 260108 - 007.028/2017  
: Heitor Franco de Andrade Junior  
: Encaminha o projeto de pesquisa: "Detecção do *Plasmodium* spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e simia na Mata Atlântica"

EQUIPE

: Heitor Franco de Andrade Junior, Fabiana Santos Silva, Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Licia Natal Fernandes, Sônia Aparecida Casari, Juarez Fuhrmann, Izilda Curado, Iole Arumi Sei, Luis Filipe Mucci, Marcio Port Carvalho, Marina Sherer, Vladimir Arraes, Igor Lucoves Sicchi, Amanda Lumy Kawanami e Thais de Moura Coletti

VIGÊNCIA

: Setembro de 2017 a Setembro de 2019

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
	<p>Endereço: Núcleo Pedra Grande: Rua do Horto, 1799 - São Paulo-SP Tel. (11) 2203-0115 Núcleo Águas Claras: Av. Senador José Ermirio de Moraes, s/n - Mairiporã - SP Núcleo Cabucu: Av. Pedro de Souza Lopes, 7903 - Guarulhos-SP Tel. (11) 2401-6217 Núcleo Engordador: Av. Cel. Sezefredo Fagundes (altura do nº 19100) - São Paulo-SP Tel. (11) 2995-3254</p> <p>Estacionamento (Núcleos Águas Claras, Engordador e Cabucu) Carros: R\$ 6; Motos: R\$ 3; Vans/micro-ônibus: R\$ 12</p> <p>Informações: (11) 2203-3266 - de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h ou por e-mail.</p>	<p>Estadual da Cantareira, para serem juntados ao acervo da Unidade.</p>
<p>Parque Estadual Alberto Löfgren</p> <p>Ao responsável pela Unidade</p> <p>Gestor: Paulo Fernando da Silva</p>	<p>Endereço: Rua do Horto, 931 Horto Florestal - São Paulo - SP CEP: 02.377-000</p> <p>Telefones para informação: (11) 2231-8555 - Ramal 2061 (11) 2231-8555 - Ramal 2056 (11) 2232-3117 E-mail: <a href="mailto:pehortoflorestal@sp.gov.br">pehortoflorestal@sp.gov.br</a></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Com relação à realização do projeto no Parque Estadual Alberto Löfgren, manifestamo-nos: <u>De acordo com a execução do projeto</u>;</li><li>• Com relação aos resultados do projeto, as informações geradas serão de: Alta prioridade;</li><li>• Com relação ao planejamento da Unidade, o Parque Estadual Alberto Löfgren possui: Plano de Manejo;</li><li>• Com relação às atividades previstas pelo projeto: não existe restrição;</li><li>• <u>As seguintes colocações devem ser observadas pelos autores, por ocasião da visita a esta Unidade:</u></li><li>• Agendar os trabalhos de campo junto à administração da Unidade, com antecedência mínima de 15 dias, fornecendo o nome de todos os membros da equipe visitante;</li><li>• Visitas de pesquisadores, representantes de outras instituições, convidados, pesquisadores estrangeiros, alunos, amigos, fotógrafos, imprensa, etc., não relacionados no projeto original como membro de equipe executora devem ser previamente notificadas e autorizadas pela administração da unidade;</li><li>• Permitir acompanhamento por pessoal da Unidade, quando o responsável da Unidade assim estabelecer;</li><li>• Atividades não previstas no projeto original estão</li></ul>



SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO FLORESTAL

Rua do Horto, 931 - CEP 02377-000 - S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555  
[www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

PROCESSO SMA N.º  
INTERESSADO  
ASSUNTO

: 260108 - 007.028/2017  
: Heitor Franco de Andrade Junior  
: Encaminha o projeto de pesquisa: "Detecção do *Plasmodium* spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e simia na Mata Atlântica"

EQUIPE

: Heitor Franco de Andrade Junior, Fabiana Santos Silva, Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Licia Natal Fernandes, Sônia Aparecida Casari, Juarez Fuhrmann, Izilda Curado, Iole Arumi Sei, Luis Filipe Mucci, Marcio Port Carvalho, Marina Sherer, Vladimir Arraes, Igor Lucoves Sicchi, Amanda Lumy Kawanami e Thais de Moura Coletti

VIGÊNCIA

: Setembro de 2017 a Setembro de 2019

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
		vetadas, devendo ser previamente notificadas e submetidas à análise e aprovação do Instituto Florestal; • Atividades de coleta de amostras da biodiversidade estão condicionadas à apresentação de cópia da licença SISBIO/IBAM. Quando renovada, apresentar cópia para ser anexada ao processo; • Somente os autores nomeados na licença do SISBIO/IBAM poderão efetuar coletas; • As intervenções a serem executadas na Unidade, como colocação de placas, pregos, faixas, distribuição de folhetos, etc. devem ser previamente e formalmente autorizadas pelo responsável pela administração da Unidade; • Havendo necessidade de acompanhamento por mateiros, guarda-parques, consultar a Unidade sobre possível disponibilidade, com antecedência mínima de 15 dias e; • Havendo necessidade de deslocamento de equipamentos, realizar por conta própria ou consultar a Unidade sobre possível disponibilidade de auxiliares, com antecedência mínima de 15 dias; • Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual Alberto Löfgren, para serem juntados ao acervo da Unidade.

*"Projeto de grande relevância por sua interface com a saúde pública. De baixo potencial de impacto às biotas locais. Sem óbices para a provação"*

Por ocasião das visitas nesta Unidade, solicitamos:

1. Agendar os trabalhos de campo junto à administração da Unidade, com antecedência mínima de 15 dias, fornecendo o nome de todos os membros da equipe visitante;
2. Visitas de pesquisadores, representantes de outras instituições, convidados, pesquisadores estrangeiros, alunos, amigos, fotógrafos, imprensa, etc., não relacionados no projeto original como membro da equipe executora devem ser previamente notificadas e autorizadas pela administração da Unidade;
3. Permitir acompanhamento por pessoal da Unidade, quando o responsável pela Unidade assim estabelecer;
4. Atividades não previstas no projeto original estão vetadas, devendo ser previamente notificadas e submetidas à análise e aprovação do Instituto Florestal;
5. Atividades não previstas no projeto original, como a captura e manipulação da fauna, estão vetadas, devendo ser previamente notificadas e submetidas à análise e aprovação do Instituto Florestal;
6. Portar a licença do SISBIO/IBAMA. Quando renovada, apresentar cópia para ser anexada ao processo;



SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO FLORESTAL

Rua do Horto, 931 - CEP 02377-000 - S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555  
[www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

PROCESSO SMA N.º : 260108 - 007.028/2017  
INTERESSADO : Heitor Franco de Andrade Junior  
ASSUNTO : Encaminha o projeto de pesquisa: "Detecção do *Plasmodium* spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e simia na Mata Atlântica"  
EQUIPE : Heitor Franco de Andrade Junior, Fabiana Santos Silva, Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Licia Natal Fernandes, Sônia Aparecida Casari, Juarez Fuhrmann, Izilda Curado, Iole Arumi Sei, Luis Filipe Mucci, Marcio Port Carvalho, Marina Sherer, Vladimir Arraes, Igor Lucoves Sicchi, Amanda Lumy Kawanami e Thaís de Moura Coletti  
VIGÊNCIA : Setembro de 2017 a Setembro de 2019

7. Somente os autores nomeados na licença do SISBIO/IBAMA poderão efetuar coletas;
8. Questionários, formulários, entrevistas orais e outras formas de abordagem de pessoal local e do público visitante devem ter o roteiro previamente submetido à ciência do responsável pela administração da Unidade;
9. Exsicatas em duplicata do material botânico coletado no projeto devem ser encaminhadas ao Herbário D. Bento Pickel, no endereço do Instituto Florestal abaixo, aos cuidados do Pesquisador João Batista Baitello, telefone (0xx11) 2231 8555, Ramal 2072, [baitello@if.sp.gov.br](mailto:baitello@if.sp.gov.br);
10. Atividades de coleta de amostras da biodiversidade estão condicionadas à apresentação de cópia da licença SISBIO/IBAMA. Quando renovada, apresentar cópia para ser anexada ao processo;
11. As intervenções a serem executadas na Unidade, como colocação de placas, pregos, faixas, distribuição de folhetos, etc. devem ser previamente e formalmente autorizadas pelo responsável pela administração da Unidade;
12. Não deixar no campo vestígios da passagem no local como resíduos, buracos, embalagens, armadilhas, tambores, etc. Trincheiras e escavações devem ser seguidas de processos de recuperação, minimizando o dano local;
13. Havendo necessidade de acompanhamento por mateiros, guarda-parques, consultar a Unidade sobre possível disponibilidade, com antecedência mínima de 15 dias e;
14. Havendo necessidade de deslocamento de equipamentos, realizar por conta própria ou consultar a Unidade sobre possível disponibilidade de auxiliares, com antecedência mínima de 15 dias.

Responsáveis por projetos com previsão de coletas devem providenciar a autorização SISBIO/IBAMA na página [http://www.ibama.gov.br/sisbio/index.php?id\\_menu=205](http://www.ibama.gov.br/sisbio/index.php?id_menu=205). Obtida a autorização, encaminhar cópia à Comissão Técnico-Científica - COTEC para ser anexado no processo respectivo. A partir de janeiro de 2008, toda e qualquer forma de coleta nas UCs deverá ser formalmente licenciada pelo SISBIO/IBAMA.

Conforme estabelece a Portaria do Diretor Geral de 23/01/90, e cientificado à V. Senhoria **nos Termos de Compromisso e de Responsabilidade assinados em 06/09/2017**, há necessidade de encaminhar à COTEC, um relatório anual, no mês de Dezembro de cada ano. Nos relatórios assinalar a área de estudos em GPS/coordenadas geográficas.

Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração das Unidades de Conservação, para serem juntados ao acervo da Unidade.

Cópia da dissertação, tese, artigos, resumos em eventos científicos e outras formas de publicações podem ser apresentados como relatório parcial e final. Não havendo possibilidade de cópias, solicita-se o encaminhamento da(s) referência(s) bibliográfica(s), que possibilite(m) o acesso a todas as informações geradas no projeto.

A utilização para outros fins que não seja a pesquisa científica, de fotografias, imagens, vídeos e outras mídias registradas nas Unidades a título deste projeto devem ser objetos de termo específico, conforme a Portaria CINP, de 09/02/1999, publicada no DOE de 10/02/1999.

Esta aprovação não implica em suporte financeiro de qualquer natureza por parte do Instituto Florestal. A participação e ou auxílio financeiro por parte do Instituto Florestal, quando houver, deverá ser detalhado e formalizado através de contratos, convênios e outros instrumentos legais pertinentes, cuja cópia deve ser juntada ao presente processo.

Para qualquer informação ou eventualidade, colocamo-nos à sua inteira disposição.

Por prestigiar a nossa instituição, agradecemos.



PROCESSO SMA N.º  
INTERESSADO  
ASSUNTO

EQUIPE

VIGÊNCIA

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

INSTITUTO FLORESTAL

Rua do Horto, 931 - CEP 02377-000 - S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555

[www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

- : 260108 - 007.028/2017
- : Heitor Franco de Andrade Junior
- : Encaminha o projeto de pesquisa: "Detecção do *Plasmodium* spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e símia na Mata Atlântica"
- : Heitor Franco de Andrade Junior, Fabiana Santos Silva, Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Licia Natal Fernandes, Sônia Aparecida Casari, Juares Fuhrmann, Izilda Curado, Iole Arumi Sei, Luis Filipe Mucci, Marcio Port Carvalho, Marina Sherer, Vladimir Arraes, Igor Lucoves Sicchi, Amanda Lumy Kawanami e Thaís de Moura Coletti
- : Setembro de 2017 a Setembro de 2019

Atenciosamente,

Israel Luiz de Lima  
COTEC - Comissão Técnico-Científica  
Instituto Florestal  
Rua do Horto, nº 931  
02377-000 - São Paulo - SP  
Fone: (011) 2231- 8555 - Ramal 2071 Fax: Ramal 2220  
[cotec2@gmail.com](mailto:cotec2@gmail.com)  
[cotec@if.sp.gov.br](mailto:cotec@if.sp.gov.br)

Anexo 2



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**  
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470  
 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br  
 Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 01 de Setembro de 2017

Ilmo(a)  
**Dr(a). Heitor Franco de Andrade Jr.**  
 (aos cuidados de Fabiana Santos Silva)


Certificamos que a proposta intitulada "**Detecção do Plasmodium spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre Alouatta guariba clamitans (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e simia na Mata Atlântica**", registrada com o nº **000368A**, sob a responsabilidade de **Heitor Franco de Andrade Jr.** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

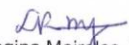
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 01/09/2017 a 01/09/2019							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Outra	invertebrado	semanas ou meses	miigramas	<i>a ser Coletado</i>	500	500	1000
Origem: Animal Silvestre - Parelheiros e Cantareira (ambos na cidade de São Paulo)					<b>TOTAL</b>		1000

Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO: 59859-1  
 Atividades(s): Coleta de Espécimes  
 Local(is): Parelheiros e Cantareira (ambos na cidade de São Paulo)

Atenciosamente,

  
 Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb  
 Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

  
 Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

## Anexo 3



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 59859-1	<b>Data da Emissão:</b> 16/08/2017 10:43	<b>Data para Revalidação*:</b> 15/09/2018
------------------------	--	---

\* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	CPF: 144.067.418-36
Título do Projeto: Detecção do Plasmodium spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre Alouatta guariba clamitans (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e símia na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Besouros Scarabaeidae nas fezes de bugios em Parelheiros e PE Cantareira	09/2017	09/2019

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Fabiana Santos Silva	Aluna de mestrado do Instituto de Medicina Tropical	327.114.698-59	239284677 SSP-SP	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO PAULO	SP	Parque Estadual da Cantareira e Parelheiros APA Capivari Mon	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 88987249**



Página 1/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59859-1	Data da Emissão: 16/08/2017 10:43	Data para Revalidação*: 15/09/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	CPF: 144.067.418-36
Título do Projeto: Detecção do Plasmodium spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre <i>Alouatta guariba clamitans</i> (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e símia na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Scarabaeidae (*Qtde: 1000)

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Coleta manual, Outros métodos de captura/coleta(armadilha pitfall)
---	---	--

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Superintendência de Controle de Endemias	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 88987249



Página 2/4





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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59859-1	Data da Emissão: 16/08/2017 10:43	Data para Revalidação*: 15/09/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	CPF: 144.067.418-36
Título do Projeto: Detecção do Plasmodium spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre Alouatta guariba clamitans (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e simia na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 88987249**



Página 3/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 59859-1</b>	<b>Data da Emissão: 16/08/2017 10:43</b>	<b>Data para Revalidação*: 15/09/2018</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	CPF: 144.067.418-36
Título do Projeto: Detecção do Plasmodium spp por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre Aouatta guariba clamitans (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e símia na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 88987249**



Página 4/4



### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59659-3	Data da Emissão: 10/04/2019 15:06:06	Data da Revalidação*: 10/04/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	CPF: 144.067.418-36
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Besouros Scarabaeidae nas fezes de bugios no Parque Estadual Carlos Botelho	04/2019	04/2020
2	Coleta de Besouros Scarabaeidae nas fezes de bugios em Parelheiros e PE Cantareira	09/2017	09/2019
3	Coleta de Besouros Scarabaeidae nas fezes de bugios na Reserva Legado das Águas	07/2018	09/2019
4	Coleta de Besouros Scarabaeidae nas fezes de bugios no Parque Fontes do Ipiranga	04/2019	04/2020

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Fabiana Santos Silva	Aluna de mestrado do Instituto de Medicina Tropical	327.114.698-59	Brasileira
2	Luis Filipe Mucci	Colaborador - Pesquisador Científico SUCEN	165.119.578-55	Brasileira
3	Gabriel Zorello Laporta	Colaborador - Pesquisador/Professor FMABC	301.745.778-85	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0598590320190410

Página 1/4



### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59859-3	Data da Emissão: 10/04/2015 15:06:06	Data da Revalidação*: 10/04/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	CPF: 144.067.418-36
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em áreas de domínio privado ou dentro das limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, quando o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da legislação vigente, ou quando de inatuação, ornado ou falta descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes de cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
7	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento de legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga	São Paulo-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
2	Parque Estadual Carlos Botelho	Tapiraí-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
3	Reserva Legado das Águas	Miracatu-SP	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
4	Parque Estadual da Cantareira e Parelheiros APA Capivarã Mon	São Paulo-SP	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0598590320190410

Página 2/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59859-3	Data da Emissão: 10/04/2019 15:06:06	Data da Revalidação*: 10/04/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	CPF: 144.067.418-36
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Scarabaeidae	1000
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Scarabaeidae	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Coleta manual, Outros métodos de captura/coleta (armadilha pitfall)

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Superintendência de Controle de Endemias	Outro

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0598590320190410

Página 3/4





SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO DE BOTÂNICA

Caixa Postal 3005  
01061-970 São Paulo, SP - Brasil

**Parque Estadual das Fontes do Ipiranga**  
**AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA Nº \_\_\_/2018**

**Data:** 30/07/2018

**Responsável:** Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte **Contato:** 11-99367-8758 / amrcd2@gmail.com

**Título do Projeto:** Detecção do *Plasmodium spp* por meio do DNA ambiental (eDNA) e aspectos da interação ecológica entre *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) com o besouro Scarabaeidae (LATREILLE, 1802) em áreas de transmissão da malária humana e símia na Mata Atlântica.

**Instituição:** Superintendência de Controle de Endemias SUCEN – Secretaria de Estado da Saúde e Instituto de Medicina Tropical de São Paulo IMTUSP

**Período:** de agosto de 2018 a agosto de 2019.

**Categoria:** ( ) TCC ( ) IC ( X ) Mestrado ( ) Doutorado ( ) Visita técnica ( ) Aprimoramento ( ) IBt – nº registro: \_\_\_\_\_ ( ) Outros: \_\_\_\_\_

**Orientador:** Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior/ **Co-orientação:** Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte

**Objetivo:** - Identificar a entomofauna dos besouros Scarabaeidae coletados nas fezes dos bugios (*Alouatta guariba clamitans*) que habitam as matas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga e descrever aspectos relacionados à ecologia e sua distribuição nas duas áreas de estudo. - Verificar o "status" reservatório dos plasmódios nos bugios que habitam as matas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, por meio do DNA ambiental (eDNA) extraído das fezes e do DNA presente no conteúdo estomacal do besouro Scarabaeidae e inferir sobre a atual dinâmica de transmissão da malária símia na área de estudo (técnica de PCR para amplificação de fragmentos de 18S rRNA e mtDNA (Cyt b) de plasmódio. - Verificar a possibilidade do rastreamento do eDNA na vigilância da malária de Mata Atlântica.

**Participantes:** Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte – Pesquisador Científico SUCEN; Luis Filipe Mucci – Pesquisador Científico SUCEN; Izilda Curado – Pesquisador Científico SUCEN; Juarez Fuhrmann – Museu de Zoologia USP; Fabiana Santos Silva – aluna de mestrado IMTUSP; Amanda Lumy Kawanami - Bolsista de Aprimoramento SUCEN; Thaysa Carolina Cantanhede Figueiredo – estagiária; Laura Nobo Costa - estagiária

**Uso do Alojamento:** ( ) sim ( X ) não **Observações:**

**OBSERVAÇÕES/CONDICIONANTES:**

1. Solicita-se que sejam observadas e respeitadas as normas que regulamentam o uso da área (Lei SNUC de julho de 2000, Capítulo III, Art. 10).
2. Esta autorização não autoriza o uso do material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte do espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal, em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *ex situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial.
3. O Responsável pela Expedição deverá apresentar RELATÓRIO FINAL ao término da validade desta autorização, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente autorização.
4. "Esta autorização não exime o pesquisador de cumprir o disposto na MP 2186-16/01 que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso a amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN, nos termos da Medida Provisória Nº 2186-16/2001 e Decreto Nº 3946/2001".
5. Autorização válida apenas para a Parque Estadual das Fontes do Ipiranga - área do Instituto de Botânica nas condições do projeto de pesquisa aprovado.

PqC. Dr. Eduardo Pereira-Cabral Gomes  
Diretor do Núcleo de Pesquisa Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba  
e Parque Estadual das Fontes do Ipiranga-PEFI

Av. Miguel Estéfano, 3687 - Água Funda  
04301-012 São Paulo, SP - Brasil  
Fone: (011) 5073-6300 - FAX: (011) 5073-3678