

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANA CLÁUDIA DA SILVA JARDELINO JORDÃO**

**Análise da dieta de morcegos insetívoros em ambientes cavernícolas através de  
metabarcoding de eDNA**

RECIFE

2019

**ANA CLÁUDIA DA SILVA JARDELINO JORDÃO**

**Análise da dieta de morcegos insetívoros em ambientes cavernícolas através de metabarcoding de eDNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Enrico Bernard

Co-orientador: Dr. Guilherme Oliveira

RECIFE

2019

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Jordão, Ana Cláudia da Silva Jardelino

Análise da dieta de morcegos insetívoros em ambientes cavernícolas através de metabarcoding de eDNA / Ana Cláudia da Silva Jardelino Jordão- 2019.

76 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Enrico Bernard

Coorientador: Guilherme Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexo

1. Quirópteros 2. Artrópodes 3. Guano I. Bernard, Enrico (orient.) II. Oliveira, Guilherme (coorient.) III. Título

599.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-184

ANA CLÁUDIA DA SILVA JARDELINO JORDÃO

**Análise da dieta de morcegos insetívoros em ambientes cavernícolas através de metabarcoding de eDNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração - Ecologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em: 21/02/2019.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Enrico Bernard (Orientador)**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres (Examinador Interno)**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia Figueira Aburjaile (Examinadora Externa)**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Hernani Fernandes Magalhães de Oliveira (Examinador Externo)**  
**Charles University**

---

**Prof. Dr. Pedro Murilo Sales Nunes (Suplente Interno)**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto (Suplente Externo)**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

A todos que acreditaram na minha capacidade intelectual e contribuíram para a realização deste estudo com os trabalhos de campo, laboratoriais, e motivacionais. Nada disso seria possível sem o vosso auxílio.  
Dedico a vocês.

## AGRADECIMENTOS

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (PPGBA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), que contribuíram e me acolheram nesta jornada de dois anos de mestrado. Também agradeço ao secretário Manoel Guimarães e ao estagiário David que sempre me auxiliaram quando as dúvidas surgiram. O trabalho de todos foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Figueira Aburjaile, Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto e Dr. Hernani Fernandes Magalhães de que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação. Aos Profs. Drs. Rodrigo Augusto Torres e Pedro Murilo Sales Nunes agradeço também pelas contribuições durante o mestrado através das disciplinas, além das colaborações como membros examinadores.

Ao Enrico Bernard, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigada pela oportunidade de conhecer mais detalhadamente o mundo dos morcegos. Tantas reuniões e, quando eu estava desestimulada, bastavam alguns minutos de conversa e lá estava eu, com o mesmo brilho no olhar do início. Obrigada por acreditar em mim, pelos incentivos, correções e ensinamentos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade (UFPE). Vocês são muito mais do que colegas de trabalho. Com vocês aprendi informações básicas e essenciais sobre os morcegos, sobre a vida e sobre a colaboração na pesquisa científica. Vocês são meus exemplos de profissionais e parceiros. Ao Eder Barbier, Fred Hintze e Mariana Delgado agradeço pelos ensinamentos e aventuras de campo. Vocês são incríveis. Fernanda Ito, obrigada por sempre me auxiliar e sanar as dúvidas moleculares. Narjara Pimentel, obrigada pelos incentivos e aventuras em campo. Você vai longe com sua competência. Aída Otalora, obrigada pela ajuda na análise de dados deste estudo e pelas delícias colombianas. Além de colegas de profissão, vocês são meus amigos de vida.

Ao Guilherme Oliveira, pela co-orientação, competência, profissionalismo e pela ótima recepção quando eu estive em Belém. Obrigada pelos incentivos e por acreditar no meu potencial. Você é o exemplo de ser humano e profissional que eu admiro. Obrigada por disponibilizar toda a sua equipe para me dar suporte nesta pesquisa.

A toda equipe de bolsistas do Instituto Tecnológico Vale (ITV) que me recebeu de braços abertos como se eu fosse um dos seus. Cada um de um lugar diferente do Brasil me fez entender o que significa parcerias. Muito obrigada pelos incentivos, auxílios técnicos e por me fazer conhecer lugares lindos e comidas deliciosas de Belém. Eder e Santelmo muito obrigada pela recepção, todo auxílio técnico e intelectual. Aprendi tanto com vocês nestes dois anos. Eder, você tem um lugar especial no meu coração. Você é um ser humano iluminado. Obrigada por tudo. Agradeço ao Renato Oliveira pelos ensinamentos em bioinformática. Obrigada por me mostrar que o mundo em linha de comando não é tão assustador. Ao Rafael Cabral por me abrigar no período em que estive em Belém. Obrigada pela amizade e ajuda. Ao José Augusto Bitencourt pelos incentivos e amizade. Ao Manoel Lopes por todo auxílio no laboratório geral. Ao Rafael Valadares pelas risadas. A Gisele Nunes pelas modas de viola que acalentavam meu coração quando a saudade de casa batia forte. Agradeço a cada um que eu conheci no ITV, Alexandra, Simone, Gisele, Wesley, Mayara, Cintia, Cecílio, Ronnie, Vitor, Talvane, Mariana e tantos outros, que me receberam de braços e sorrisos abertos.

Agradeço à equipe de Licenciamento Ambiental e Espeleologia - Vale S.A., Xavier Prous, Mariane Ribeiro e Thadeu Pietrobon por me auxiliarem total e integralmente nos campos realizados na FLONA de Carajás. Obrigada por todos os ensinamentos, risadas e companheirismo. Sem vocês esta pesquisa não seria possível. Com certeza, esses momentos sempre estarão presentes na minha memória. Agradeço também ao senhor Antônio Lima que nos guiou pela Floresta Amazônica em segurança e partilhou conosco tantos casos de sua vida.

Aos meus pais, Ana e Cleonaldo, e minha irmã, Érika, por acreditarem no meu potencial e me incentivarem a buscar sempre mais. Aos meus pais, obrigada por investirem na minha educação desde a infância. Vocês sempre me ensinaram a importância de estudar e de continuar dia após dia, apesar das dificuldades. Obrigada por entender a importância da educação a qual vocês foram privados. E obrigada por entender minhas ausências durante esse período do mestrado.

Ao meu amigo, companheiro de vida e de amor, Vítor Jordão, que partilha comigo sua vida e nosso crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela paciência nestes dois anos. Não foi fácil superar o meu foco no mestrado e minhas ausências pelas longas viagens. Obrigada por me ajudar durante as crises de ansiedade. Como sempre, você é a calma na minha tempestade. Obrigada por ser minha inspiração de ser humano e profissional. Obrigada por estar comigo e por ser tão incrível. Te amo!

Agradeço as minhas amigas mais antigas, Stéfane e Helô, Edna e Marcela por entenderem minhas ausências e pelos incentivos. Obrigada por acreditarem em mim!

A Alexandra Elbakyan (Sci-hub) pela disponibilização de grande parte da literatura desta pesquisa. Este projeto acadêmico revolucionário que leva a ciência livre e aberta para todos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio e financiamento através do PPGBA. Ao ITV e a Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa - FUNDEP pela concessão de bolsa de financiamento durante o mestrado.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio pela concessão das licenças de coleta de material biológico.

E por fim, agradeço aos governantes que criaram e incentivaram as políticas públicas educacionais permitindo a ascensão educacional e social de tantas pessoas neste país, inclusive a minha. Como disse Malala Yousafzai, jovem ativista paquistanesa e laureada com diversos títulos incluindo o Prêmio Nobel da Paz de 2014, “Eu sonho com um país onde a educação prevalecerá”. Eu também sonho com isso, Malala.

À todos que contribuíram de qualquer forma para a realização desta pesquisa, **MUITO OBRIGADA!**

*“A maioria de nós anda pelo mundo sem olhar para ele, sem se dar conta de suas belezas, de suas maravilhas, e da estranha e às vezes terrível intensidade da vida que nos cerca.”*

*Primavera Silenciosa - Rachel Carson, 1962*

## RESUMO

Os morcegos insetívoros são indicados como principais consumidores noturnos de insetos, incluindo espécies consideradas pragas agrícolas e vetores de doenças para humanos. A maioria das identificações dos artrópodes consumidos é realizada através da observação direta das fezes e/ou do conteúdo estomacal dos morcegos, dificultando a identificação específica das presas. Recentemente, para facilitar esta identificação, desenvolveram-se técnicas moleculares não invasivas como metabarcoding atrelado ao sequenciamento de alto rendimento. Mediante este processo é possível realizar o sequenciamento simultâneo de diferentes DNAs extraídos de amostras de materiais conglomerados, como o guano dos morcegos. Estudos que utilizam DNA ambiental precisam da padronização dos procedimentos moleculares e os protocolos devem ser testados em quaisquer estudos iniciais. Amostras provenientes de cavernas na Caatinga, em Pernambuco, na Mata Atlântica, em Sergipe, e na Floresta Amazônica, no Pará, foram armazenadas em etanol 96%, em solução de estabilização RNA Later ou in natura e posteriormente congeladas em ultra freezer -80°C. Portanto, neste estudo foram testados esses três métodos de estocagem de guano, dois kits de extração de DNA e a padronização da amplificação, incluindo a escolha dos iniciadores para o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I. Para isso, foram selecionados três conjuntos de iniciadores diferenciando-se pelo tamanho adequado a tecnologia de sequenciamento de nova geração Illumina: UEA2/UEA3 (130 pb) sequenciado no MiniSeq (paired-end 300 ciclos), UEA3/UEA4 (370 pb) e UEA5/UEA6 (350 pb), ambos sequenciados no MiSeq (paired-end 600 ciclos). As sequências geradas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A coleta de guano em todas as cavidades resultou num total de 397 amostras. Deste total, 250 amostras foram selecionadas para a extração do DNA. Para os testes de estocagem, extração e amplificação do DNA foram selecionadas doze amostras. O método de armazenamento mais eficaz foi in natura, seguido daquele com adição de buffer e por último a adição de etanol 96%. Para os testes de amplificação com os três conjuntos de iniciadores foram selecionadas 13 amostras. Após os testes com os iniciadores, o fragmento de 130 pb foi selecionado para o sequenciamento de 29 amostras. Neste sequenciamento foram geradas 13.636 OTUs. Destas, 1.117 OTUs (8,2%) possuem similaridade igual ou acima de 97% com o banco de dados de nucleotídeos do NCBI e 408 OTUs (2,98%) são representativas para táxons de artrópodes com similaridade igual/acima de 97%. Lepidoptera e Diptera foram as

ordens mais frequentes nas amostras, incluindo espécies pragas agrícolas e vetores de doenças. A diversidade dos itens alimentares encontradas na dieta dos morcegos insetívoros reforça a capacidade desses animais na prestação dos serviços ecossistêmicos, principalmente quando suprimem artrópodes que podem causar prejuízos à agricultura e outros que podem ser transmissores de doenças.

**Palavras-chave:** Artrópodes. Guano. Quirópteros.

## ABSTRACT

Insectivorous bats are indicated as the main nocturnal insect consumers, including species considered agricultural pests and disease vectors for humans. Most of the arthropod identifications consumed are carried out by direct observation of feces and / or stomach contents of bats, making it difficult to identify prey specimens. Recently, to facilitate this identification, non-invasive molecular techniques have been developed as metabarcoding coupled to high throughput sequencing. Through this process it is possible to carry out the simultaneous sequencing different DNA extracted from samples of conglomerate materials, such as guano from bats. Studies using environmental DNA require the standardization of molecular procedures and protocols should be tested in any initial studies. Samples from caves in the Caatinga, Pernambuco, Mata Atlântica, Sergipe, and the Amazon Forest, Pará, were stored in 96% ethanol, in a stabilization solution of RNA Later or in natura and then frozen in an ultra-freezer at -80°C. Therefore, three methods of guano storage, two DNA extraction kits and the standardization of amplification, including the choice of primers for the mitochondrial Cytochrome C Oxidase I gene, were tested in this study. Three sets of primers were selected, differentiated by the size of the next-generation Illumina sequencing technology: UEA2 / UEA3 (130 bp) sequenced in the MiniSeq (paired-end 300 cycles), UEA3 / UEA4 (370 bp) and UEA5 / UEA6 (350 bp), both sequenced in MiSeq (paired-end 600 cycles). The sequences generated were grouped into operational taxonomic units (OTUs). The collection of guano in all wells resulted in a total of 397 samples. From this total, 250 samples were selected for DNA extraction. For the DNA storage, extraction and amplification tests, twelve samples were selected. The most effective storage method was in natura, followed by that with buffer addition and finally the addition of 96% ethanol. For the amplification tests with the three sets of primers, 13 samples were selected. After testing the primers, the 130 bp fragment was selected for the sequencing of 29 samples. In this sequencing were generated 13,636 OTUs. These OTUs, 1,117 OTUs (8.2%) have similarity to or above 97% with the NCBI nucleotide database and 408 OTUs (2.98%) are representative for arthropod taxa with similarity to above 97%. Lepidoptera and Diptera were the most frequent orders in the samples, including agricultural pests and disease vectors. The diversity of food items found in the diet of insectivorous bats reinforces the ability of these animals to provide ecosystem

services, especially when they suppress arthropods that can cause damage to agriculture and others that may be disease vectors.

**Key-words:** Arthropods. Guano. Chiroptera.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
1.2.1 Objetivo geral .....	24
1.2.2 Objetivos específicos .....	24
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
2.1 Áreas de estudo .....	25
2.2 Coleta e armazenamento de amostras .....	26
2.3 Análises Moleculares .....	27
2.3.1 Extração de DNA.....	27
2.3.2 Amplificação do DNA .....	28
2.3.3 Construção da Biblioteca e Sequenciamento.....	32
2.4 Análises bioinformáticas – Identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais	33
2.5 Análise de Dados .....	34
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 Teste de estocagem, extração e amplificação de DNA.....	36
3.2 Identificação e Riqueza das OTUs.....	43
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
4.1 Serviços de supressão de insetos, incluindo “pragas agrícolas” e vetores de doenças	50
4.2 Aspectos metodológicos .....	52
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>64</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>66</b>
<b>APÊNDICE C</b> .....	<b>67</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente estão descritas cerca de 1300 espécies de morcegos (SIMMONS, 2005; FENTON & SIMMONS, 2015), que apresentam grande diversidade de hábitos alimentares, incluindo espécies nectarívoras, até frugívoras, hematófagas, carnívoras, piscívoras e insetívoras (FENTON, 1992). Os morcegos insetívoros são considerados os principais consumidores noturnos de artrópodes, controlando populações de lepidópteros, coleópteros, dípteros, homópteros, e hemípteros, incluindo espécies consideradas pragas agrícolas e vetores de zoonoses (e.g. BOHMANN et al., 2011; BOYLES et al., 2011; KUNZ et al., 2011; MASLO et al., 2017). O guano produzido pelos morcegos é frequentemente apontado como vital para a manutenção da riqueza dos ecossistemas cavernícolas (FERREIRA, 2004; GNASPINI, 1992). Estes serviços ecológicos providenciados pelos morcegos desempenham um papel preponderante no equilíbrio dos ecossistemas, assim garantem benefícios socioeconômicos relevantes ao Homem (e.g. DUCUMMON, 2000). De extrema importância na conservação destas espécies de morcegos e preservação dos serviços ecológicos por eles prestados, os estudos ecológicos sobre o forrageamento e a dieta da maioria espécies de morcegos insetívoros são ainda escassos, sobretudo na região Neotropical (e.g. AGUIAR & ANTONINI, 2008; BRACAMONTE, 2013; EMILIANO, et al, 2017; FENTON et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2015).

A maioria dos estudos de dieta dos morcegos foi realizada através da Grande parte destes estudos foi realizada através da observação direta das fezes e/ou do conteúdo estomacal dos morcegos. observação direta das fezes e/ou do conteúdo estomacal dos morcegos implica a identificação de diminutos fragmentos de artrópodes, o que dificulta a identificação específica da presa (CLARE, et al., 2014; KUNZ et al., 2011). Quando possível, esta identificação está também dependente da existência de partes mais duras ou características de alguns insetos, como antenas, élitros, apêndices ou partes das patas que escapam ao processo mastigatório e digestivo, assim como de um elevado nível de expertise do observador (CLARE, et al., 2014; KUNZ et al., 2011). Além destas metodologias serem bastante trabalhosas e demoradas, várias espécies/famílias de insetos menores e/ou de corpo macio são claramente subestimadas no seu peso na dieta dos morcegos, uma vez que passam despercebidas ao observador

por serem completamente digeridas pelo morcego (BOHMANN et al., 2011; CLARE, et al., 2014; KUNZ et al., 2011).

Procurando resolver estes problemas no estudo de dieta de morcegos, novas técnicas moleculares, tais como sequenciamento de nova geração (NGS), começaram a ser empregadas na última década (e.g. BOHMANN et al., 2011; CLARE et al., 2014; SALINAS-RAMOS et al., 2017; ZEALE et al., 2011). Estas técnicas permitem complementar e ampliar a possibilidade de identificação de táxons que não eram possíveis utilizando análises morfológicas tradicionais (CLARE et al., 2014). A técnica de DNA Metabarcoding permite a identificação dos táxons utilizando o DNA geralmente degradado de amostras ambientais, como nas fezes, solos ou na água (BOHMANN et al., 2014; TABERLET et al., 2012). Através desse processo é possível realizar o sequenciamento simultâneo de milhões de genes, extraídos de amostras de materiais misturados, como o guano dos morcegos (BOHMANN et al., 2014; SALINAS-RAMOS et al., 2017). Por meio do metabarcoding, uma técnica não invasiva, é possível investigar, por exemplo, se a diversidade total de uma amostra individual é maior ou menor que de outra amostra de outro lugar, permitindo a comparação da riqueza, composição e diversidade da dieta de diferentes espécies e em diferentes ambientes (CLARE; SYMONDSON; FENTON, 2014).

Em uma abordagem pioneira para o Brasil, esta dissertação utilizou a técnica de metabarcoding para identificar e quantificar insetos presentes no guano de morcegos cavernícolas. Na seção Referencial Teórico elaborei uma fundamentação teórica com detalhes sobre os morcegos insetívoros e os serviços ecossistêmicos prestados por estas espécies, além da contribuição de seu guano no aporte energético para as cavidades onde elas se abrigam. Apresento também as vantagens e desvantagens da utilização da técnica de DNA Metabarcoding na identificação dos itens alimentares presentes na dieta de morcegos insetívoros. Em seguida, apresento a Dissertação propriamente dita, composta por uma análise comparativa das metodologias de estocagem do guano, da escolha do melhor kit de extração do DNA, da padronização da etapa de PCR e da escolha do conjunto de *primers* utilizados. Além disso, faço uma análise qualitativa sobre a riqueza e diversidade de insetos presentes no guano em cavidades em diferentes ambientes (Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Caatinga). Este estudo gerou dados inéditos sobre a riqueza e diversidade de insetos consumidos por morcegos no Brasil, e forneceu contribuições para se afirmar que estas espécies prestam importantes serviços no controle de populações de insetos noturnos. Os dados aqui

gerados têm implicações diretas e indiretas para a valoração destes serviços, e podem ser úteis inclusive para setores econômicos brasileiros, como o agronegócio.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Cerca de 20% de todas as espécies de mamíferos conhecidas pertencem à ordem dos morcegos (Chiroptera) e podem ser encontrados em todas as regiões do planeta, com exceção das regiões polares extremas (SIMMONS, 2005; FENTON & SIMMONS, 2015; TEELING et al., 2018). São os únicos mamíferos que realizam voo verdadeiro, e até hoje foram catalogadas cerca de 1308 espécies de morcegos (CATALOGUE OF LIFE, 2018). Além desta elevada diversidade taxonômica, estes animais ocupam os mais variados nichos ecológicos, apresentando uma grande variedade de hábitos alimentares como insetivoria, carnivoria, piscivoria, frugivoria, nectarivoria e hematofagia (KUNZ & PIERSON, 1994).

A Ordem Chiroptera encontra-se dividida em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (JONES & TEELING, 2006; TSAGKOGEOGA et al., 2013). Na região Neotropical ocorrem apenas famílias de morcegos pertencentes a Yangochiroptera. As nove famílias com ocorrência na região Neotropical são caracterizadas por uma amplitude de dieta, incluindo vários e diferentes itens (FENTON, 1992; REIS et al., 2007). De qualquer forma, a insetivoria é bastante comum nos morcegos neotropicais. A predação de insetos é fruto da história evolutiva (WETTERER, ROCKMAN, SIMMONS, 2000; MONTEIRO & NOGUEIRA, 2011), força de mordida e constituição do crânio das espécies (SANTANA & DUMONT, 2010). Adaptações nos crânios das diferentes espécies permitem que algumas delas consumam uma maior gama de insetos (FREEMAN, 1981), incluindo situações de dietas espécie-específicas.

Ao contrário das espécies frugívoras, que dispõem de um volume relativamente amplo de dados sobre suas dietas (e.g. FLEMING & HEITHAUS, 1981; LOBOVA & MORI, 2005), a composição da dieta dos morcegos insetívoros é ainda relativamente pouco estudada, tanto no Brasil quanto no restante da região neotropical (e.g. AGUIAR & ANTONINI, 2008; CARVALHO et al., 2008; BRACAMONTE, 2013; EMILIANO et al., 2017; FENTON et al., 1999). Teoricamente, essa carência de informações se deve a uma combinação de fatores incluindo baixas taxas de captura das espécies insetívoras em redes de neblina (principal método empregado em estudo de campo), uma vez que estes morcegos detectam as redes com mais facilidade, devido ao seu uso quase constante da ecolocalização (PEDRO & TADDEI, 1997; SIMMONS & VOSS, 1998;

SAMPAIO et al., 2003), bem como na dificuldade na identificação dos itens alimentares presentes em suas fezes por causa da fragmentação das partes de insetos que restam após a digestão, o que exige um elevado nível de expertise do observador (FREEMAN, 1979; KUNZ & WHITAKER, 1983). Outro problema comum é a clara subestimação de várias espécies/famílias de insetos menores e/ou de corpo macio, que por serem totalmente digeridas passam totalmente despercebidas ao observador (BOHMANN et al., 2011; CLARE, et al., 2014; KUNZ et al., 2011).

Morcegos insetívoros mastigam suas presas de insetos muito mais do que alguns outros animais insetívoros, como pássaros, deixando poucos fragmentos identificáveis no trato gastrointestinal ou no guano (FREEMAN, 1979; CLARE et al., 2009). Por este motivo, a identificação por meio tradicional de análise de fragmentos fecais é, no caso dos morcegos, uma tarefa complexa, dispendiosa de tempo e energia, e que produz resultados nem sempre satisfatórios (CLARE, 2014). Existem estudos que reconhecem a predação dos insetos noturnos pelos morcegos, mas não é bem documentada no que refere-se quantos e quais insetos são consumidos, principalmente nos relacionamentos entre predador-presa (KUNZ et al., 2011). Pesquisas desenvolvidas na Europa (e.g. ARRIZABALAGA-ESCUADERO et al., 2018; ZEALE et al., 2011) e América do Norte (e.g. BOYLES et al., 2011; CLARE et al., 2009, 2011, 2014a, 2014b; MASLO et al., 2017; SALINAS-RAMOS et al., 2015 ) já se utilizam de abordagens genômicas para identificar a magnitude do consumo de presas e tentar quantificar o impacto econômico desse controle populacional, que muitas vezes inclui pragas agrícolas e vetores de doenças (KUNZ et al., 2011).

Assim, entender os hábitos alimentares dos morcegos pode ser fundamental para compreender as relações tróficas nos ecossistemas, em especial em ambientes cavernícolas. Quando retornam diariamente aos seus abrigos em cavernas e defecam nestes locais, os morcegos contribuem com um input de energia essencial para os ambientes cavernícolas, trazendo para o seu interior restos de frutos, sementes e insetos em grande quantidade, na forma de guano (FERREIRA, 2004). O guano produzido pelos morcegos é frequentemente apontado como vital para a manutenção da riqueza dos ecossistemas cavernícolas (FERREIRA, 2004; GNASPINI, 1992). Estes ambientes contêm uma fauna extremamente especializada e dependente das cavernas, compostas por organismos troglóxenos (que utilizam cavernas, mas retornam regularmente ao exterior para completar seu ciclo de vida), troglófilos (que realizam todo o seu ciclo de vida em cavernas, mas podem utilizar ambientes externos), e troglóbios (organismos

que sobrevivem exclusivamente em ambientes cavernícolas) (FERREIRA, 2004). De fato, esta relação de dependência é tão especializada, que vários organismos dependem exclusivamente do guano dos morcegos para sua sobrevivência (guanóbios) (FERREIRA, 2004; GNASPINI, 1992). Desta forma, podemos assumir que a relação morcegos-caverna-fauna cavernícola representa uma associação ecológica altamente especializada, complexa e frágil, uma vez que a manutenção de comunidades inteiras de espécies troglóbias depende da presença, frequência e da quantidade de morcegos e de seu guano nestes locais (FERREIRA, 2004; GNASPINI, 1992).

### **Uso do metabarcoding para avaliação da dieta de morcegos insetívoros**

Informações úteis já foram geradas sobre os estudos de dieta realizados através da observação direta do conteúdo estomacal/intestinal ou das fezes (POMPANON et al., 2012). No entanto, a abordagem via análise morfológica por meio de microscopia é fruto de um trabalho intesinvo e necessita de pessoas treinadas para a identificação dos fragmentos de plantas ou animais semi-digeridos (CLARE, 2014; POMPANON et al., 2012; SUNDERLAND et al., 2005). Além disso, a análise direta mostra-se insuficiente na identificação da dieta de animais que se alimentam de líquidos (a maioria do invertebrados) e alimentos mais facilmente digeridos, como insetos de corpo macio, néctar e partes de algumas plantas, como o endocarpo ou exocarpo (CLARE, 2014; FREEMAN, 1979; POMPANON et al., 2012). Nestas situações a identificação dos táxons, muitas vezes, vai apenas até ao nível de classe ou ordem (CLARE et al., 2009; CLARE, 2014).

O uso de técnicas moleculares através do sequenciamento do DNA surgiu como uma boa alternativa para refinar esse processo. Moléculas de DNA podem ser extraídas de amostras ambientais de fezes, solos, água e ar sem a necessidade de isolar qualquer organismo alvo. A esse tipo de amostra denomina-se DNA ambiental (eDNA) (BOHMANN et al., 2014; TABERLET et al., 2012). Geralmente o eDNA é caracterizado por uma mistura complexa de DNA degradado, em pequenos fragmentos, de diferentes tipos de organismos (TABERLET et al., 2012). A primeira referência ao eDNA é datada em 1987 e referiu-se a um método para extrair DNA microbiano de sedimentos (OGRAM et al., 1987). No entanto, o termo realmente começou a ser utilizado no início dos anos 2000, também por microbiologistas (*e.g.* HANDELSMAN, 2004; RONDON et al., 2000). A utilização mais frequente do eDNA em estudos ecológicos deu-se a partir da disponibilidade de sequenciadores da nova geração (Next

Generation Sequencing - NGS), permitindo ignorar a etapa clonagem, muitas vezes cara e demorada, e o sequenciamento de produtos de PCR (TABERLET et al., 2012). Essa abordagem baseada na amplificação dos fragmentos do DNA degradado da amostra ambiental foi chamada de DNA Metabarcoding (POMPANON et al., 2011).

A técnica de Metabarcoding é uma das abordagens moleculares mais amplamente empregadas para a detecção da biodiversidade em amostras ambientais (BOHMANN et al., 2014). Apesar de suas limitações, como um banco de dados incipiente para artrópodes Neotropicais, uma das decisões iniciais em um estudo de Metabarcoding é qual região do marcador e iniciadores (*primers*) usar.

A escolha dos marcadores é frequentemente guiada pela cobertura do banco de dados de referência de DNA, portanto estudos que envolvem animais geralmente dependem de marcadores dentro da região padronizada do código de barras do gene COI, particularmente bem representado no Barcode of Life Data System (BOLD) (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). No entanto, é virtualmente impossível conceber iniciadores de sequenciação metabólica que não tenham desemparelhamentos para, pelo menos, algumas das sequências das espécies alvo, e tais erros de emparelhamento podem resultar em desvios de amplificação por PCR (ZEALE et al., 2011). Em resumo, os pesquisadores devem tomar várias decisões ao longo de um estudo de Metabarcoding antes de finalmente obter uma visão geral sobre quais táxons estão presentes nas amostras (ALBERDI et al, 2017; ZEALE et al., 2011). A sugestão de diversos pesquisadores é de que a metodologia utilizada deve ser ajustada com base no tipo de amostra, complexidade e degradação do DNA (ALBERDI et al., 2018; LEAR et al., 2017; POMPANOM et al., 2012).

### **Serviços ecossistêmicos prestados pelos morcegos insetívoros**

Certos recursos e processos fornecidos por ecossistemas naturais são críticos para a manutenção da vida na Terra, e estes conjuntos são chamados de serviços ecossistêmicos (DAILY, 2003). Estes processos diretamente ou indiretamente resultam de benefícios que contribuem para o bem-estar humano, sendo por isso mensuráveis em termos econômicos (COSTANZA et al., 1997; MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005).

Subestimados até alguns anos atrás, os morcegos desempenham um papel na manutenção dos ecossistemas e sua utilidade específica na qualidade da vida humana, porém nos últimos anos, uma atenção especial foi dada ao valor econômico dos serviços de ecossistema prestados por morcegos, especialmente aqueles relacionados com a agricultura (e.g. BOYLES et al., 2011, 2013; GHANEM & VOIGT, 2012; KASSO & BALAKRISHNAN, 2013; KUNZ et al., 2011; RICCUCCI & LANZA 2014). Um dos mais importantes serviços ecossistêmicos prestados por morcegos insetívoros é o controle de artrópodes herbívoros, incluindo as “pragas agrícolas” (GHANEM & VOIGT, 2012; KUNZ et al., 2011). Segundo Boyles et al. (2011), nos Estados Unidos, o valor dos serviços de supressão de insetos daninhos prestados por morcegos insetívoros é de cerca de US\$ 22,9 bilhões por ano para o setor agrícola (variando de US\$ 3,7 a 53 bilhões/ano). Estas estimativas incluem a redução dos custos das aplicações de pesticidas, reduzindo o desenvolvimento de resistência a pesticidas assim como na produção de alimentos mais saudáveis e diminuir o impacto negativo dos pesticidas no ambiente. Portanto, há um crescente interesse de produtores americanos na atração de morcegos para as suas próprias terras, como por exemplo a instalação abrigos artificiais – as “caixas-abrigo” (LONG et al., 1998).

Os insetos herbívoros, considerados muitas vezes como “pragas agrícolas”, são um grande problema na agricultura, destruindo entre 18% e 26% dos produção anual de culturas em todo o mundo, estimando-se um valor deficitário de mais de US\$ 470 bilhões (CULLINEY, 2014; HILL, 2008; POLLINI, 2013). Os insetos da ordem Lepidoptera estão entre as principais pragas agrícolas em muitas partes do mundo (HILL, 2008; BINCHENG, 1994), representando 91% das pragas agrícolas na Europa. As mariposas pertencem à ordem Lepidoptera e grande maioria está ativa à noite, tornando-se um recurso alimentar consumido por muitas espécies de morcegos (BETZHOLTZ & FRANZÉN, 2013; NEW, 2004).

Na América do Norte e na Europa foram já realizados alguns estudos sobre o controle biológico por morcegos, além disso as estratégias de forrageamento e a dieta de muitas espécies de morcegos são bem conhecidas (e.g. BECK, 1995; BOYLES et al., 2011, 2013; CLEVELAND et al., 2006; DIETZ et al. 2009; FEDERICO et al., 2008; LANZA, 2012; VAUGHAN, 1997; WHITAKER, 1995). Por exemplo, verificou-se que insetos que se concentram em grandes quantidades em paisagens cultivadas, e que são consideradas pragas, foram encontrados na dieta de várias espécies de morcegos (revisado em RICCUCCI & LANZA, 2014). Coutts, Fenton e Glen (1973) estimaram

que, em média, morcegos insetívoros mantidos em cativeiro podem consumir até 25% de sua massa corporal em peso equivalente em insetos por noite. Em ambientes naturais estas estimativas podem aumentar em razão dos gastos energéticos mais elevados, como é o caso de *Myotis lucifugus* que, na época de lactação, pode consumir 9,9 g de insetos, o que equivale a mais de 125% de sua massa corporal (KUNZ & STREN, 1995). Há estudos que indicam que alguns indivíduos são capazes de selecionar ativamente as suas presas alimentares (*e.g.* BUCHLER, 1976), outros apontam que os morcegos insetívoros são generalistas e oportunistas, alimentando-se de uma diversidade de grupos taxonômicos correlacionada com a disponibilidade e abundância de artrópodes no habitat (FENTON & MORRIS, 1976; KALCOUNIS-RUEPPELL et al., 2007).

Segundo dados estatísticos do Produto Interno Bruto (PIB), divulgados pelo Instituto Brasileiro Geografia e Estatística (IBGE), o agronegócio contribuiu com cerca de 24% para PIB do Brasil em 2017 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2017) assumindo um papel preponderante para o desenvolvimento do país. No entanto, o papel dos morcegos neotropicais no controle de pragas que afetam esta indústria é pouco conhecido. Deste modo, estudos que se propõem a avaliar a dieta dos morcegos insetívoros neotropicais podem ser úteis para gerar subsídios sobre a quantificação do benefício da conservação destas espécies para setores econômicos importantes, tais como a agricultura e o agronegócio.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Esta dissertação teve como objetivo geral identificar e quantificar, através do método de DNA metabarcoding, os artrópodes consumidos por morcegos insetívoros em cavernas em três ecossistemas brasileiros (Mata Atlântica, Caatinga e Floresta Amazônica).

### **1.2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- i. Identificar a mais adequada metodologia para a estocagem visando a extração de DNA do guano de morcegos;
- ii. Identificar o kit com o melhor resultado para extração de DNA para amostras de guano de morcegos;
- iii. Estabelecer o melhor método de padronização de amplificação do DNA oriundo do guano de morcegos por meio de PCR, incluindo a escolha do melhor conjunto de *primers* utilizados;
- iv. Caracterizar, no menor nível taxonômico possível, a riqueza de itens alimentares nas amostras provenientes de diferentes ambientes;
- v. Determinar a diversidade de itens alimentares e identificar os recursos mais utilizados;
- vi. Investigar a ocorrência de insetos no guano caracterizados como “pragas agrícolas” ou com potencial de atuarem como vetores de doenças ao ser humano.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Áreas de estudo

As coletas do guano foram realizadas em 13 diferentes cavidades localizadas na Mata Atlântica, no semiárido e na Amazônia Brasileira (Apêndice A). No semiárido foi amostrada a caverna “Meu Rei” (08°29'14.1"S, 37°16'48.8"W), inserida no Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau), em Pernambuco. Esta caverna está sendo acompanhada há pelo menos quatro anos, como parte de um projeto de monitoramento em longo prazo realizado pelo Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade, ao qual este estudo está vinculado. Esta caverna tem sua temperatura umidade monitoradas em intervalos de hora desde agosto de 2018, e também foi objeto de estudo de vários outros projetos (AZEVEDO; BERNARD, 2015). A caverna Meu Rei está inserida em uma Unidade de Conservação de Proteção Integral, o PARNA Catimbau, criado pelo Decreto Lei 4.340 de 22/08/2002, e possui uma área total de 62.300 hectares distribuída entre os municípios de Buíque, Tupanatinga e Ibitimir, no semiárido de Pernambuco (SNE, 2002). As amostras da caverna “Meu Rei” foram coletadas mensalmente no ano de 2017.

A coleta da caverna do Urubu (10°43'58.1"S; 37°09'56.0"), localizada no município Divina Pastora, em Sergipe, ocorreu em janeiro/2017. Esta cavidade está inserida num remanescente da Mata Atlântica, manguezal, pastagens de braquiária e bosques de bambus (DIAS et al., 2015; LEÃO et al., 2003). Esta é uma caverna classificada como “hot cave”, pois possui elevada e constante temperatura combinada com a temperatura do corpo de uma grande congregação de morcegos (). Esta cavidade possui uma alta densidade populacional de morcegos insetívoros, frugívoros e hematófagos. Esta grande população gera uma enorme quantidade de fezes gerando pilhas de guano em alguns salões da caverna (LEÃO et al., 2003).

As coletas realizadas na Amazônia ocorreram em cavernas de minério de ferro situadas na Floresta Nacional de Carajás (FLONA de Carajás), Estado do Pará, Brasil. Carajás é uma das regiões mais importantes para a extração de minério de ferro do mundo (COSTA et al., 2018). Além disso, está em uma região de floresta amazônica, com alta biodiversidade, contendo potencialmente mais de 100 espécies de morcegos (COSTA et al., 2018). A região também possui milhares de cavidades inseridas próximas às áreas de mineração. A FLONA de Carajás (05°52' e 06°33' S; 49°53 e

50°45`W), localizada no sudeste do Pará, na Amazônia, é uma Unidade de Conservação Federal, criada em 1998, em partes dos municípios de Parauapebas, Canaã dos Carajás e Água Azul do Norte (BEZERRA et al., 2017). Foram selecionadas 11 cavidades na FLONA de Carajás (Apêndice B), região sob influência direta e indireta da mineração do complexo mineral de Carajás. Cinco cavidades foram amostradas na chamada Serra Sul, município de Canaã dos Carajás, localizada no sudoeste da FLONA, e as seis cavidades restantes foram amostradas na chamada Serra Norte, município de Parauapebas, localizada no norte da Flona de Carajás. Foram realizadas três expedições de coleta nas cavidades da FLONA Carajás, numa frequência semestral, em janeiro de 2017, junho de 2017, e janeiro de 2018.

## **2.2 Coleta e armazenamento de amostras**

Em cada cavidade o guano foi coletado diretamente do chão, em 10 pontos aleatórios, de forma a obter-se pelo menos 10 amostras por cavidade. Entretanto, algumas cavidades da FLONA de Carajás não continham guano suficiente para completar dez amostras. Neste caso, optou-se por coletar a maior quantidade possível de material. As amostras foram acondicionadas em tubos estéreis de 50 ml, e das 397 amostras coletadas, 12 foram selecionadas aleatoriamente para testes de identificação da melhor abordagem para acondicionamento, extração e amplificação de DNA. Destas 12 amostras, três foram oriundas da Caatinga e três da Mata Atlântica, sendo estas seis armazenadas em etanol 96%. Seis amostras foram provenientes da Floresta Amazônica, e foram armazenadas em dois tratamentos diferentes: três amostras em solução de estabilização RNA Later, e três no seu estado natural, congeladas em ultra freezer o mais rapidamente.

Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Genômica, no Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS), em Belém, Pará, para onde foram transportadas em temperatura ambiente até serem refrigeradas o mais rapidamente em -20 °C. O tempo entre a coleta e processamento variou dependendo da origem das amostras. Em Pernambuco, após as coletas, as amostras foram primeiramente acondicionadas à -20 °C no freezer localizado na base de pesquisa do PELD-Catimbau (Pesquisa Ecológica de Longa Duração). Após 24h foram transportadas até o Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade em um período de 4 horas (tempo de deslocamento entre o PARNA e o Laboratório), e

estocadas em freezer em temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem transportadas 30 dias depois ao ITV-DS. Lá, as amostras foram armazenadas em ultra freezer ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até a realização da extração do DNA e demais procedimentos moleculares, que ocorreram nos 30 dias subsequentes.

As amostras de Sergipe foram coletadas em Janeiro/2017, transportadas em 2h em temperatura ambiente até um freezer convencional ( $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), e posteriormente transportadas por avião até o Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade, onde foram acondicionadas em freezer ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Estas amostras ficaram estocadas neste local durante 180 dias, até serem transportadas ao ITV-DS em Junho/2017 para os procedimentos moleculares. As amostras de Carajás foram coletadas em 11 cavidades diferentes, sendo uma coleta por cavidade por dia. Ao final de cada coleta, as mostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após o fim da coleta em todas as cavidades, 11 dias após as amostras congeladas foram transportadas de avião até o ITV-DS, no período máximo de 2h onde foram estocadas em ultra freezer ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Essa metodologia de estocagem no ITV-DS se repetiu em junho/2017 e janeiro/2018 e as análises moleculares decorreram em menos de uma semana após o congelamento das amostras.

## **2.3 Análises Moleculares**

### **2.3.1 Extração de DNA**

As 12 amostras selecionadas foram submetidas à extração de DNA com os Kits de extração Power Fecal ® DNA Isolation e Power Soil ® DNA Isolation (Qiagen, CA, USA). Como sugerido no protocolo de extração dos kits, foram pesados 0,25 g de guano de cada amostra armazenada com etanol, com RNA later e *in natura*, todas congeladas. As extrações foram executadas em uma capela de fluxo laminar exclusiva para a extração de DNA e acrescidas de um controle negativo de extração de DNA com água.

Em seguida, o DNA extraído foi quantificado através de fluorometria utilizando o Kit de quantificação de DNA Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific) e fluorímetro Qubit ® 3.0 (Thermo Fisher Scientific), seguindo as informações do fabricante. A qualidade do DNA foi também analisada através de Gel de agarose 1,2%.

### 2.3.2 Amplificação do DNA

Os iniciadores (*primers*) universais para o gene mitocondrial COI foi selecionado a partir do conjunto de *primers* degenerados referidos por ZHANG & HEWITT (1997). Neste estudo, os autores testaram 13 combinações de *primers* para COI (Tabela 1). As combinações de iniciadores escolhidos possuem potencial de universalidade para amplificar um grupo diversificado de insetos, cobrindo as principais ordens da Classe Insecta (ZHANG; HEWITT, 1997). Para este estudo foram selecionados 5 iniciadores (UEA2, UEA3, UEA4, UEA5, UEA6) (Figura 1) escolhidos após análise de abrangência de identificação de táxons de insetos e do tamanho do fragmento, sendo este último uma característica primordial para o sequenciamento, visto que a tecnologia Illumina possui limitação no tamanho do fragmento a ser sequenciado.

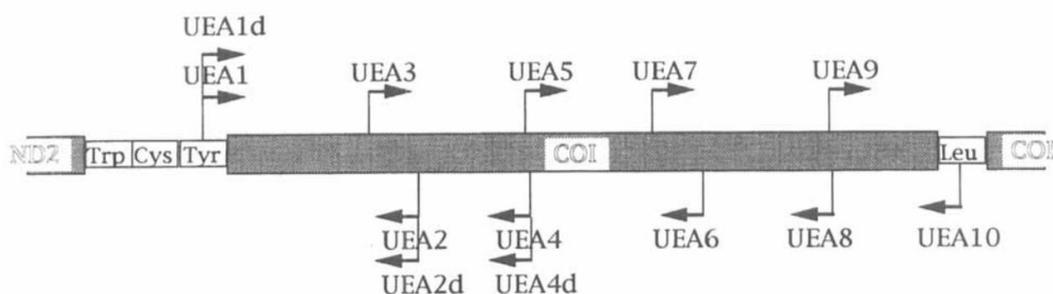
Tabela 1: Conjunto de *primers* referidos por Zhang e Hewitt (1996) e utilizados nos testes de otimização de PCR de amostras de guano de morcegos coletadas em cavidades localizadas na Caatinga, Floresta Amazônica e Floresta Atlântica, entre os anos de 2017 e 2018.

Nome comum	Nome padrão	Tamanho (bases)	Sequência (5' para 3')
UEA1 (Brent)	TY -N-1430	26	GAATAATTCCCATAAATAGATTTACA
UEA1d (Helen)	N-N-1430d	26	GAAWAATTCCYATAAWTARATTTAC A
UEA2 (Alison)*	C1-N-1844	26	TCAAGATAAAGGAGGATAAACAGTTC
UEA2d (Maddy)	C1-N-1843d	23	GMWARWGGWGGRTAWACWGTTCA
UEA3 (Gof)*	C1-J-1763	24	TATAGCATTCCCACGAATAAATAA
UEA4 (Douda)*	C1-N-2087	24	AATTTCCGGTCAGTTAATAATATAG
UEA4d (Diane)	C1-N-2096d	25	GANGTATTWARRTTTCGRTCWGTTA
UEA5 (Dave)*	C1-J-2090	24	AGTTTTAGCAGGAGCAATTACTAT
UEA6 (Nic)*	C1-N-2395d	29	TTAATWCCWGTWGGNACNGCAATRA TTAT
UEA7 (Xing)	C1 -J-2369	24	TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC

UEA8 (Inger)	C1-N-2735	24	AAAAATGTTGAGGGAAAAATGTTA
UEA9 (Steve)	C1-J-2753	26	GTAAACCTAACATTTTTTCCTCAACA
UEA10 (Pat)	TL2-N-30 14	25	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA

Fonte: Zhang e Hewitt (1996). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI *primers* in insects. *Insect Molecular Biology*, 6(2), 143-150. \**Primers* utilizados neste estudo.

Figura 1: Esquema representando a posição dos iniciadores no gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI). Os iniciadores UEA2, UEA3, UEA4, UEA5 e UEA6 foram utilizados neste estudo para amplificar o DNA das amostras fecais de morcegos insetívoros coletadas em 2017 e 2018 em cavernas localizadas na Caatinga, Floresta Amazônica e Floresta Atlântica.



Fonte: Zhang e Hewitt (1996). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI *primers* in insects. *Insect Molecular Biology*, 6(2), 143-150.

O par de iniciadores UEA2/UEA3 contém 130 pares de base (pb) e foi selecionado devido ao seu pequeno tamanho, suficiente para a abordagem de sequenciamento paired-end (sequenciamento das duas extremidades do fragmento gênico que facilitam o alinhamento) no MiniSeq – Illumina paired-end 300 ciclos (ILLUMINA, 2016). Os iniciadores UEA3/UEA4 corresponde a uma região variável do gene COI e contém 370 pb (ZHANG; HEWITT, 1997). Este fragmento amplifica com sucesso espécies das ordens Thysanura, Odonata, Orthoptera, Hemiptera e Diptera (ZHANG; HEWITT, 1997). Os iniciadores UEA5/UEA6 contém 350 pb e corresponde a uma região conservada do gene COI (ZHANG; HEWITT, 1997). Este fragmento amplifica com sucesso espécies das ordens Thysanura, Odonata, Orthoptera, Hemiptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera (ZHANG; HEWITT, 1997). Os conjuntos de primers UEA3/UEA4 e UEA5/UEA6 foram sequenciados no MiSeq-Illumina, utilizando a estratégia de paired-end de 600 ciclos. Para otimizar a detecção da verdadeira diversidade das amostras e minimizar os erros de sequenciamento, as amostras foram

preparadas em triplicatas para a amplificação e sequenciamento dos fragmentos selecionados, como sugerido por ALBERDI et al. (2018).

No sequenciamento de nova geração, os amplicons requerem sequências de oligonucleotídeos adaptadores, ou seja, sequências de DNA de fita simples complementares a outra sequência presente na “flow cell” (lâmina de vidro que contém canais preenchidos de oligonucleotídeos complementares aos adaptadores das bibliotecas) onde ocorre o sequenciamento (ILLUMINA, 2017). No entanto, desenhar um *primer* contendo as sequências adaptadoras diminui a eficiência dele na hora da PCR (ILLUMINA, 2017), e para realizar a amplificação de boa qualidade empregou-se uma PCR de dois passos. Na primeira PCR, utilizou-se os primers sem os adaptadores para amplificar o DNA presente nas fezes. Os reagentes utilizados na primeira reação de PCR são detalhados na Tabela 2. Já na segunda PCR utilizou-se os primers com os adaptadores, incorporando-os aos amplicons gerados na primeira rodada de PCR (PROSSER; HEBERT, 2017).

As duas reações de PCR foram realizadas com o kit de amplificação GoTaq® PCR Core Systems (Promega) para o volume final de 25 µl, indicados por PROSSER; HEBERT (2017), com adaptações exclusivas para o conjunto de primers e adaptadores Illumina utilizados neste estudo. Todas as reações foram realizadas em uma capela de fluxo laminar exclusiva para a PCR e as amplificações ocorreram no termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Tabela 2: Reagentes utilizados na primeira reação de PCR na amplificação do DNA extraído de amostras fecais de morcegos insetívoros, coletadas na Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, no período entre 2017 e 2018. Amplificação para o três conjuntos de *primers* (UEA2/UEA3; UEA3/UEA4; UEA5/UEA6) sem os adaptadores Illumina, descritos por ZHANG e HEWITT (1997).

<b>Reagente</b>	<b>Volume (µl)</b>
H <sub>2</sub> O Nuclease free ultrapura	6,375
Tampão (Buffer) 5x Colorless	5,0
dNTPs	0,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,0
Primer 1 (Forward) – <i>Sem adaptadores Illumina</i>	2,0
Primer 2 (Reverse) – <i>Sem adaptadores Illumina</i>	2,0
Taq Polimerase HotStart	0,125
TBT-PAR 1x	5,0
DNA	2,0

Fonte: A autora (2019).

As temperaturas utilizadas durante os ciclos de PCR foram indicadas por ZHANG; HEWITT (1997). No entanto, as temperaturas de anelamento sugeridas por estes autores não resultaram em PCR de boa qualidade. Diante disso, novos testes de otimização das temperaturas de anelamento (42 °C, 45 °C, 48 °C, 50 °C, 52 °C, 55 °C) foram realizados para cada conjunto de primers. A primeira reação de PCR seguiu uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, corrida de 35 ciclos de PCR com 40 segundos de desnaturação à 95 °C, 1 minuto de temperatura de anelamento para cada conjunto de primers (UEA2/UEA3: 48 °C; UEA3/UEA4: 48°C ; UEA5/UEA6: 45 °C) e 1 minuto e 30 segundos de temperatura de extensão a 72 °C. A extensão final foi de 7 minutos a 72 °C, finalizando o ciclo na etapa “Hold”, de 0 a 4 °C, para a conservação das amostras até o momento da estocagem.

Os produtos de amplificação da primeira PCR foram utilizados na segunda PCR, com os primers acrescidos dos adaptadores Illumina (Tabela 3), e diminuição nos ciclos na etapa de anelamento. Os procedimentos utilizados nesta segunda PCR seguiram uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, corrida de 20 ciclos de PCR com um minuto de desnaturação à 95 °C, 1 minuto de temperatura de anelamento para cada conjunto de primers (UEA2/UEA3: 48 °C; UEA3/UEA4: 48°C ; UEA5/UEA6: 45 °C) e 1 minuto e 30 segundos de temperatura de extensão à 72 °C. A extensão final foi de 7 minutos a 72 °C.

Tabela 3: Reagentes utilizados na segunda reação de PCR na amplificação do DNA extraído de amostras fecais de morcegos insetívoros, coletadas na Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, no período entre 2017 e 2018. Amplificação para o três conjuntos de *primers* (UEA2/UEA3; UEA3/UEA4; UEA5/UEA6), descritos por ZHANG e HEWITT (1997). Primers acrescidos dos adaptadores Illumina amplificação dos produtos da primeira PCR.

<b>Reagente</b>	<b>Volume (µl)</b>
H <sub>2</sub> O Nuclease free ultrapura	4,375
Tampão (Buffer) 5x Colorless	5,0
dNTPs	0,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,0
Primer 1 (Forward) – <i>Com adaptadores Illumina</i>	2,0
Primer 2 (Reverse) – <i>Com adaptadores Illumina</i>	2,0
Taq Polimerase HotStart	0,125
TBT-PAR 1x	5,0
DNA ( <i>Produto da PCR 01</i> )	4,0

Fonte: A autora (2019).

Amostras fecais de mamíferos possuem inibidores da reação enzimática da PCR, como células epiteliais da parede do trato digestivo, e contaminantes do DNA provenientes das bactérias e das presas (MARRERO et al, 2009). Devido à presença de inibidores de PCR nas fezes não removidos durante a extração, foi necessária a utilização de aditivos de PCR. O aditivo testado foi o TBT-PAR composto por trealose, albumina de soro bovino (BSA) e polissorbato-20 (Tween-20) (SAMARAKOON; WANG; ALFORD, 2013).

Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose a 1,5%, corados com o corante fluorescente Syber Safe® Thermo Fisher Scientific (10 µl para cada 100 ml de gel de agarose). Foram utilizados 5 µl de produto de PCR, 3,0 µl de DNA-ladder 50 pb (Invitrogen™) e 1,0 µl de corante azul de bromofenol. Após a aplicação das amostras, o gel de agarose foi inserido na cuba contendo tampão TBE 0,5x iniciando-se a corrida por meio da corrente elétrica (BRAMMER, 2001). Antes da construção da biblioteca genômica foi realizada a purificação dos amplicons gerados na amplificação do DNA. A purificação foi realizada através de Agencourt® AMPure® XP (Agencourt Bioscience Corporation), seguindo o protocolo do fabricante.

### **2.3.3 Construção da Biblioteca e Sequenciamento**

Após a padronização das metodologias de acondicionamento das amostras, da extração de DNA das 250 amostras e amplificação do DNA foram selecionadas 13 amostras aleatoriamente e com DNA acima de 1ng/uL para a construção da biblioteca e o sequenciamento das três regiões do gene COI (UEA2/UEA3; UEA43/UEA4, UEA5/UEA6) para testar a eficiência do sequenciamento. Os adaptadores de sequências únicas (índexes/barcodes) foram adicionados a cada amostra através da etapa de PCR Index utilizando o Kit de preparação de Biblioteca Genômica Nextera XT (ILLUMINA, 2018), de acordo com os procedimentos informados pelo protocolo oficial do fabricante. Nesta etapa, o DNA com os adaptadores foi adicionado aos barcodes através de PCR com os seguintes ciclos: 72 °C por 3 minutos, 95 °C por 30 segundos; 12 ciclos de: 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, 72 °C por 5 minutos. Logo após, a biblioteca de DNA foi purificada com Agencourt® AMPure® XP (Agencourt Bioscience Corporation) de acordo com as informações sugeridas pelo protocolo.

Após a purificação das bibliotecas, o DNA foi quantificado através de fluorometria utilizando o Kit de quantificação de DNA Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific) e fluorímetro Qubit ® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). A qualidade do DNA também foi testada através do tamanho dos fragmentos, do ponto de vista molecular da quantidade de pares de bases, por meio de eletroforese através do Bioanalyzer Agilent Technology 2100 (PANARO et al., 2000). Para isso, utilizou-se 1 µl da biblioteca não diluída no Bioanalyzer Agilent Technology 2100, usando um chip de DNA de alta sensibilidade.

Em seguida, a biblioteca foi normalizada, processo que equaliza a quantidade de DNA em cada biblioteca para assegurar uma representação igualitária de todas as amostras (ILLUMINA, 2016). Após a normalização da biblioteca, foi elaborada a etapa de construção do Pool de bibliotecas que combinou volumes iguais de bibliotecas normalizadas em um único tubo. O pool de bibliotecas foi codificado com 15% de PhiX (biblioteca padrão da Illumina utilizada nas corridas de sequenciamento de amplicons para aumentar a diversidade de fragmentos e permitir um bom sequenciamento) antes do sequenciamento na plataforma Illumina MiniSeq, para o fragmento de 130 pb, através do kit de reagentes MiniSeq High Output (300-ciclos) e Illumina MiSeq, para os fragmentos de 350 pb e 370 pb, através do kit de reagentes MiSeq High Output (600-ciclos) (ILLUMINA, 2016).

#### **2.4 Análises bioinformáticas – Identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais**

No sequenciamento Illumina, as amostras são geradas em arquivos no formato .fastq após o sequenciamento. Neste formato, cada amostra do arquivo .fastq contém informações sobre a identificação da amostra, a sequência gerada, linha identificadora de pontuação de qualidade (indicada por a+) e o índice de qualidade. Em seguida, as sequências “forward” e “reverse” foram montadas através do montador Pear (ZHANG et al., 2013). A ferramenta PRINSEQ (SCHMIEDER & EDWARDS, 2011) foi utilizada para verificar o controle de qualidade e o pré-processamento das amostras, como o corte dos barcodes e a filtragem das sequências montadas. As sequências foram filtradas (trimmadas) através do índice de qualidade PHRED (EWING et al., 1998). Este índice atribui um valor de qualidade a cada base sequenciada, correspondendo a um número inteiro entre 0 e 99 associados ao erro de leitura. Neste estudo, foi utilizado um PHRED

20, ou seja, as bases com valor PHRED menor do que 20 foram descartadas. Além disso, sequências menores de 50 bases também foram descartadas.

Após a filtragem e a montagem das sequências (reads) cada caractere de espaço nos arquivos foi substituído por “\_”. Em seguida, os arquivos em formato .fastq foram convertidos para arquivos do tipo .fasta, geralmente escrito em uma única linha que contém as sequências, símbolos e nomes. Por fim, todos os arquivos em formato .fasta foram unidos num único arquivo chamado “AllSamples.fasta”. Logo após, o sufixo do nome das amostras foi retirado. No arquivo com as amostras concatenadas, foi aplicado o pipeline “qiime\_COI.sh”, adequado ao marcador utilizado neste estudo.

Após o sequenciamento, a interseção das triplicatas foi realizada e as sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs – Operational Taxonomic units) (ANDÚJAR et al., 2018; CLARE et al., 2016). Estas OTUs são então relacionadas à taxonomia através da comparação das sequências com base em bancos de dados de nucleotídeos disponíveis no GenBank – NCBI (e.g. BOHMANN et al., 2011; CLARE et al., 2011, 2014; SALINAS-RAMOS et al., 2017). As OTUs identificadas como únicas (singletons) ou sem a taxonomia atribuída (unassigned) foram retiradas das análises pela incerteza do táxon representado ou a geração de uma quimera (ALBERDI et al., 2018; LEAR et al., 2018; POMPANON et al., 2012).

## 2.5 Análise de Dados

As variáveis Total de OTUs, OTUs com similaridade igual/acima de 97% com o banco de dados NCBI-nt, OTUs de Artrópodes e OTUs de Artrópodes com similaridade igual/acima de 97% foi comparada entre os três conjuntos de iniciadores testados neste estudo (UEA2/UEA3; UEA3/UEA4; UEA5/UEA). Para isso, foi avaliada a normalidade das variáveis usando o teste de Shapiro-Wilk, o qual indicou que as variáveis Total de OTUs ( $W = 0.88$ ,  $p = 0.0007$ ), OTUs com similaridade igual /acima de 97% ( $W = 0.80$ ,  $p = 9.37 \times 10^{-6}$ ) e OTUs de Artrópodes ( $W = 0.88$ ,  $p = 0.0007$ ) não apresentam uma distribuição normal. Entretanto, a variável OTUs de Artrópodes com similaridade igual/acima de 97% apresentou uma distribuição normal ( $W = 0.96$ ,  $p = 0.13$ ). As três variáveis não normais foram testadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e a variável paramétrica foi analisada com uma análise de variância (ANOVA) de um fator. Para determinar as diferenças entre os iniciadores, foi usado um teste *post hoc* de Tukey usando o pacote *PMCMRplus* (POHLERT, 2014). Os

resultados foram considerados como significativos com um  $p < 0,05$ . Todos as análises foram feitos no software R (v.3.4.4 (R Core Team 2018)). Além disso, também foi calculada a frequência percentual de ocorrência (BOHMANN et al., 2011) pra verificar a porcentagem de OTUs dos táxons de insetos que aparecem nas amostras.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Teste de estocagem, extração e amplificação de DNA

Onze das 12 amostras analisadas com o kit Power Fecal DNA Isolation foram quantificadas com mais de 1 ng/μL. As amostras extraídas com o Kit Power Soil DNA Isolation tiveram pouca quantidade de DNA extraído, e cinco das 12 amostras ficaram abaixo de 1 ng/μL de DNA, apresentado na Figura 2. Usando o Kit Power Fecal, a extração de DNA do guano armazenado *in natura* gerou, em média, 18,2 ng/ul de DNA (variando entre 6,37 ng/ul – 40ng/ul), enquanto a extração do material com RNA later gerou em média 8,4 ng/ul de DNA (0,647 ng/ul – 14,0 ng/ul), e o material estocado com etanol 96% 3,6 ng/ul (1,67 ng/ul – 5,04), conforme representado na Tabela 4. Usando o Kit Power Soil, o método *in natura* também foi o que gerou maior quantidade de DNA extraído (média 7,1 ng/ul; 0,45 ng/ul – 21,9 ng/ul), seguido do material armazenado com RNA later (2,53 ng/ul; 0,21 ng/ul - 6,93 ng/ul), e etanol 96% (0,66 ng/ul; 0,08 ng/ul – 1,07), de acordo com o demonstrado na Tabela 4.

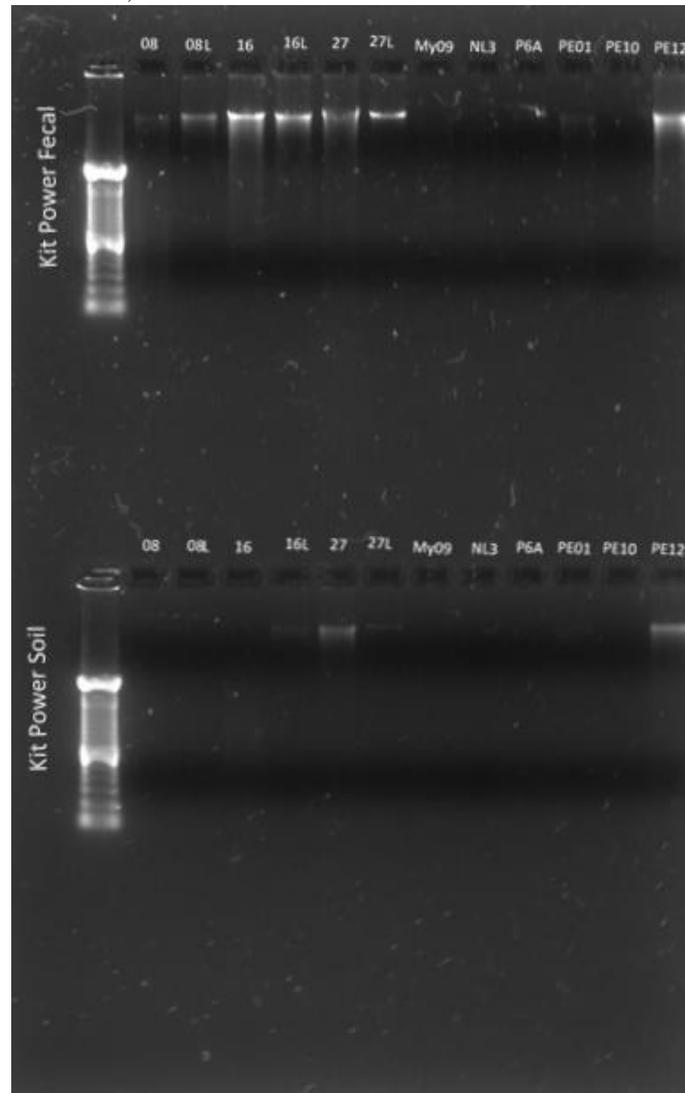
Tabela 4: Quantificação de DNA de amostras fecais de morcegos insetívoros através do método de fluorometria, no fluorímetro Qubit. Comparação da quantidade de DNA extraído com os kits de extração Power Fecal (PF) e Power Soil (PS), nos métodos de acondicionamento das amostras *in natura*, RNA later e etanol 96%.

Origem	Amostras	Tratamento (ng/ul)					
		In natura		RNA Later		Etanol	
		PF	PS	PF	PS	PF	PS
Amazônia	08	17,9	0,45	10	0,6	-	-
	16	40	3,16	14	6,93	-	-
	27	6,29	6,55	8,9	2,38	-	-
Mata Atlântica	MY09	-	-	-	-	5,04	0,84
	NL3	-	-	-	-	3,99	1,07
	P6A	-	-	-	-	1,67	0,08
Caatinga	01	8,67	3,54	-	-	-	-
	10	-	-	0,65	0,21	-	-
	12	>600 <sup>1</sup>	21,9	-	-	-	-
Média		18,22	7,12	8,39	2,53	3,57	0,66

Fonte: A autora (2019).

<sup>1</sup> diluição 1:10 = 6,37 ng/μl

Figura 2: Eletroforese em Gel de Agarose 1,2% dos DNAs provenientes de amostras fecais de morcegos insetívoros cavernícolas extraídos a partir dos Kits Power Fecal e Power Soil das amostras acondicionadas em etanol 96%, RNA later e in natura, detalhadas na Tabela 4.



Fonte: A autora (2019).

Em relação à amplificação, o fragmento UEA2/UEA3 gerou um total de 27766 OTUs, seguido pelo fragmento UEA5/UEA6, com 10849 OTUs, e o fragmento UEA3/UEA4, com 2606 OTUs. Baseado no banco de dados NCBI-nt, o fragmento UEA2/UEA3 também gerou a maior quantidade de OTUs acima de 97% de similaridade (2267 OTUs), seguido do fragmento UEA5/UEA6 (1135 OTUs) e UEA3/UEA4 (823 OTUs) (Tabela 5). No entanto, quando avaliamos a proporção de OTUs acima de 97% de similaridade perante o total de OTUs, UEA3/UEA4 foi o fragmento que gerou o maior percentual de OTUs acima de 97% de similaridade com

31,5%. Os fragmentos UEA5/UEA6 e UEA2/UEA3 geraram 10,7% e 8,1%, respectivamente.

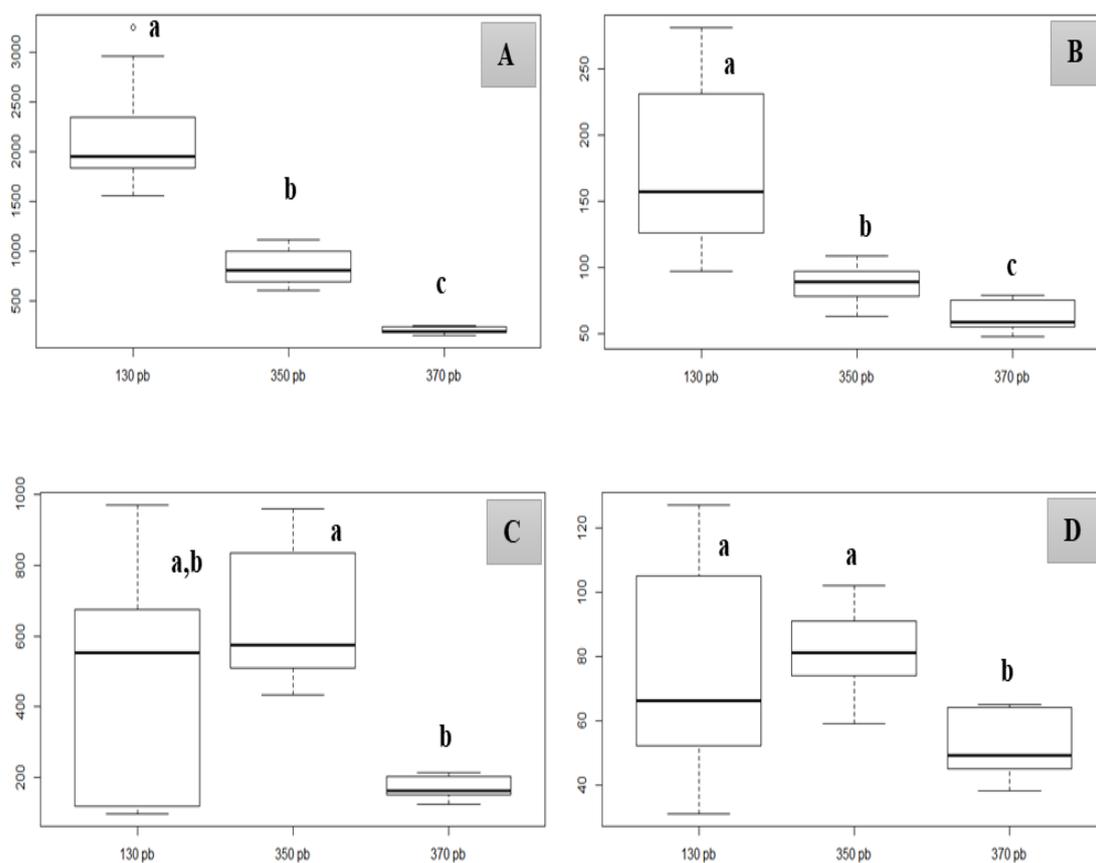
Considerando apenas OTUs de artrópodes, o fragmento o UEA2/UEA3 gerou 5836 OTUs, UEA3/UEA4 gerou 2223 OTUs e UEA5/UEA6 gerou 8518 OTUs. Ao selecionar apenas as OTUs para artrópodes iguais ou acima de 97% de similaridade, o fragmento UEA2/UEA3 gerou 978 OTUs, UEA3/UEA4 gerou 688 OTUs e UEA5/UEA6 gerou 1059 OTUs. Ao avaliar a proporção das OTUs de artrópodes igual/maior do que 97% de similaridade perante o total de OTUs dos artrópodes, UEA3/UEA4 foi o fragmento que gerou o maior percentual, com 30,9%, seguido por UEA2/UEA3 (23,4%) e UEA5/UEA6 (12,9%).

A diferença de amplificação foi estatisticamente significativa entre os fragmentos analisados para o Total de OTUs (KW = 33,8;  $p = 4,5 \times 10^{-8}$ ; gl = 2), Total de OTUs igual/acima 97% de similaridade (KW = 29,17;  $p = 4,62 \times 10^{-7}$ ; gl = 2), Total de OTUs dos Artrópodes (KW = 14,71;  $p\text{-value} = 0,0006$ ; gl = 2) e OTUs dos Artrópodes igual/acima de 97% de similaridade ( $F = 6,05$ ;  $p = 0,0054$ ; gl = 2).

A partir das comparações *post-hoc* observou-se que o número Total de OTUs foi significativamente diferente entre os três fragmentos. O maior número de OTUs totais foi gerado pelo fragmento 130 pb e foi significativamente diferente dos gerados pelos fragmentos 350 pb ( $p = 0,01$ ) e 370pb ( $p = 1,8 \times 10^{-8}$ ). O fragmento 350 pb gerou um número intermediário de Total de OTUs e foi significativamente diferente aos gerados pelo fragmento 370 pb ( $p = 0,01$ ), o qual gerou o menor número de total de OTUs (Figura 3A). O número Total de OTUs igual/acima 97% de similaridade apresentou a mesma tendência que o número total de OTUs onde o maior número total de OTUs igual/acima 97% de similaridade foi gerado pelo fragmento 130 pb e foi significativamente diferente dos gerados pelos fragmentos 350 pb ( $p = 0,014$ ) e 370pb ( $p = 4,8 \times 10^{-7}$ ). O fragmento 350 pb gerou um número intermediário de Total de OTUs e foi significativamente diferente a os gerados pelo fragmento 370 pb ( $p = 0,046$ ), o qual gerou o menor número de total de OTUs (Figura 3B). O Total de OTUs dos Artrópodes gerado pelos fragmentos 130 pb e 350 pb foram similares entre sim ( $p = 0,13$ ). O Total de OTUs dos Artrópodes gerado pelo fragmento 370 pb só foi significativamente diferente aos gerados pelo fragmento 350 pb ( $p = 0,0004$ ) (Figura 3C). Finalmente, as OTUs dos Artrópodes igual/acima de 97% de similaridade gerado pelos fragmentos 130 pb e 350 pb foram similares entre sim ( $p = 0,75$ ) e foram significativamente diferentes

aos gerados pelo fragmento 370 pb ( $p = 0,04$  para 130pb e 370pb;  $p = 0,005$  para 350pb e 370pb) (Figura 3D)

Figura 3: Boxplot sobre as análises estatísticas de dissimilaridade entre os fragmentos UEA2/UEA3 (130pb), UEA3/UEA4 (370pb) e UEA5/UEA6 (350pb). A) Dissimilaridade entre os fragmentos nas amostras de Totais de OTUs. B) Dissimilaridade entre os fragmentos nas amostras das OTUs totais com similaridade igual/acima de 97%. C) Dissimilaridade entre fragmentos das OTUs representativas dos Artrópodes. D) Dissimilaridade das OTUs dos artrópodes com similaridade igual/acima de de 97%. As letras minúsculas (a, b, c) indicam a correlação entre os fragmentos. As caixas para representam os percentis 25 e 75, as retas (fio de bigodes) representam os limites de confiança de 95% e as linhas pretas dentro das caixas representam as medianas. Os círculos mostram outliers e as letras indicam diferenças significativas.



Fonte: A autora (2019).

Tabela 5: OTUs geradas a partir da extração de DNA de amostras fecais de morcegos insetívoros em cavernas situadas na Caatinga e Floresta Amazônica, coletadas entre 2017 e 2018. As OTUs geradas foram comparadas para os três conjuntos de *primers*, UEA2/UEA3, UEA3/UEA4 e UEA5/UEA6. Número de OTUs identificadas com 90%, 95% e 97% de similaridade com os Bancos de Dados para COI no BOLD e NCBI. Seleção das OTUs representativas para artrópodes acima de 90%, 95% e 97% de similaridade com os bancos de dados.

<b>Amostra</b>	<b>Procedência</b>	<b>Total OTUs</b>	<b>OTUs &gt; 90% similaridade</b>	<b>OTUs &gt; 95% similaridade</b>	<b>OTUs &gt; 97% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;90% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;95% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;97% similaridade</b>
<b>UEA2-UEA3 (130pb)</b>									
<b>MB 211</b>	S11D-83	1978	1193	554	157	581	250	137	87
<b>MB 214</b>	S11C-41	1638	1255	645	231	720	517	257	123
<b>MB 217</b>	S11B-94	1557	962	450	136	458	226	101	60
<b>MB 223</b>	N5S-M2-99	2964	2126	807	227	716	352	113	66
<b>MB 224</b>	N5S-M2-19	2303	1619	665	170	568	312	118	62
<b>MB 227</b>	SB-62	3247	2274	911	281	971	530	224	127
<b>MB 230</b>	N4E-22	2341	1581	716	242	675	371	186	117
<b>MB 233</b>	N4WS-72	2455	1798	796	236	552	336	171	105
<b>MB 236</b>	PE 08.2017	1839	1423	422	126	117	83	65	52
<b>MB 239</b>	PE 09.2017	1945	1511	483	157	170	133	99	75
<b>MB 242</b>	PE 10.2017	1830	1425	400	100	97	71	42	31
<b>MB 245</b>	PE 11.2017	1841	1423	406	107	106	76	50	39
<b>MB 248</b>	PE 12.2017	1828	1410	396	97	105	69	47	34

Tabela 5: OTUs geradas a partir da extração de DNA de amostras fecais de morcegos insetívoros em cavernas situadas na Caatinga e Floresta Amazônica, coletadas entre 2017 e 2018. As OTUs geradas foram comparadas para os três conjuntos de *primers*, UEA2/UEA3, UEA3/UEA4 e UEA5/UEA6. Número de OTUs identificadas com 90%, 95% e 97% de similaridade com os Bancos de Dados para COI no BOLD e NCBI. Seleção das OTUs representativas para artrópodes acima de 90%, 95% e 97% de similaridade com os bancos de dados. (Continuação)

<b>Amostra</b>	<b>Procedência</b>	<b>Total OTUs</b>	<b>OTUs &gt; 90% similaridade</b>	<b>OTUs &gt; 95% similaridade</b>	<b>OTUs &gt; 97% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;90% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;95% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;97% similaridade</b>
<b>UEA3-UEA4 (370pb)</b>									
<b>MB 211</b>	S11D-83	189	184	85	55	161	131	75	45
<b>MB 214</b>	S11C-41	215	183	117	69	191	163	108	61
<b>MB 217</b>	S11B-94	183	148	93	59	151	121	79	49
<b>MB 223</b>	N5S-M2-99	171	145	90	52	145	121	76	43
<b>MB 224</b>	N5S-M2-19	179	151	89	55	157	132	79	46
<b>MB 227</b>	SB-62	153	128	78	51	132	110	68	41
<b>MB 230</b>	N4E-22	157	134	79	48	123	105	63	38
<b>MB 233</b>	N4WS-72	181	154	92	56	156	132	80	47
<b>MB 236</b>	PE 08.2017	248	216	148	79	213	184	129	65
<b>MB 239</b>	PE 09.2017	236	206	140	77	203	176	123	65
<b>MB 242</b>	PE 10.2017	216	192	119	69	183	162	104	59
<b>MB 245</b>	PE 11.2017	237	208	132	78	201	173	113	65
<b>MB 248</b>	PE 12.2017	241	202	130	75	207	172	113	64
<b>TOTAL</b>		<b>2606</b>	<b>2251</b>	<b>1392</b>	<b>823</b>	<b>2223</b>	<b>1882</b>	<b>1210</b>	<b>688</b>

Tabela 5: OTUs geradas a partir da extração de DNA de amostras fecais de morcegos insetívoros em cavernas situadas na Caatinga e Floresta Amazônica, coletadas entre 2017 e 2018. As OTUs geradas foram comparadas para os três conjuntos de primers, UEA2/UEA3, UEA3/UEA4 e UEA5/UEA6. Número de OTUs identificadas com 90%, 95% e 97% de similaridade com os Bancos de Dados para COI no BOLD e NCBI. Seleção das OTUs representativas para artrópodes acima de 90%, 95% e 97% de similaridade com os bancos de dados. (Continuação)

<b>Amostra</b>	<b>Procedência</b>	<b>Total OTUs</b>	<b>OTUs &gt; 90% similaridade</b>	<b>OTUs &gt; 95% similaridade</b>	<b>OTUs &gt; 97% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;90% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;95% similaridade</b>	<b>OTUs Artrópodes &gt;97% similaridade</b>
<b>MB 211</b>	S11D-83	746	651	344	82	575	514	319	74
<b>MB 214</b>	S11C-41	732	644	357	89	551	497	327	81
<b>MB 217</b>	S11B-94	688	590	312	69	493	436	285	64
<b>MB 223</b>	N5S-M2-99	600	534	288	85	434	395	270	80
<b>MB 224</b>	N5S-M2-19	800	675	340	97	561	478	314	91
<b>MB 227</b>	SB-62	680	595	331	78	510	459	317	75
<b>MB 230</b>	N4E-22	887	697	337	72	594	480	291	62
<b>MB 233</b>	N4WS-72	620	524	273	63	443	380	240	59
<b>MB 236</b>	PE 08.2017	1106	1039	658	109	961	918	638	102
<b>MB 239</b>	PE 09.2017	1113	1046	622	101	951	907	597	95
<b>MB 242</b>	PE 10.2017	1010	933	551	91	836	789	531	86
<b>MB 245</b>	PE 11.2017	997	935	581	102	859	818	566	99
<b>MB 248</b>	PE 12.2017	870	803	484	97	750	704	469	91
<b>TOTAL</b>		<b>10849</b>	<b>9666</b>	<b>5478</b>	<b>1135</b>	<b>8518</b>	<b>7775</b>	<b>5164</b>	<b>1059</b>

Fonte: A autora (2019).

### 3.2 Identificação e Riqueza das OTUs

A coleta de guano em todas as cavidades resultou num total de 397 amostras. Deste total, 250 foram selecionadas para a extração do DNA. Após os testes de amplificação entre os três fragmentos do gene COI testados anteriormente, o fragmento UEA2/UEA3 (130 pb) foi selecionado para o sequenciamento de 29 amostras. Neste sequenciamento foram geradas 13.636 OTUs. Destas, 1.117 OTUs (8,2%) possuem similaridade igual ou acima de 97% com o banco de dados de nucleotídeos do NCBI (Figura 4) e 408 OTUs (2,98%) são representativas para táxons de artrópodes com similaridade igual/acima de 97%. As 13326 OTUs restantes indicaram similaridade abaixo de 97% com sequências de organismos não-alvos como bactérias, fungos, algas e morcegos.

Foram associados 382 táxons de artrópodes às OTUs com similaridade igual/acima de 97% (Figura 5). A ordem Lepidoptera apresentou a maior quantidade de OTUs geradas (163, sendo oito famílias, 20 gêneros e 17 espécies), seguida de Hemiptera (127, sendo duas famílias, um gênero e uma espécie), Diptera (56, sendo 11 famílias, 12 gêneros e nove espécies), Hymenoptera (24, sendo cinco famílias, cinco gêneros e três espécies), Orthoptera (04, sendo uma família, um gênero e uma espécie), Blattodea (02, sendo uma família, um gênero e uma espécie) e Trichoptera (01, representando uma família, um gênero e uma espécie) (Apêndice C). Dentre as espécies identificadas para Lepidoptera destacam-se *Pyrausta panopealis* e *Samea multiplicalis* (Família Crambidae), *Pleuroprucha asthenaria* (Família Geometridae), *Mocis latipes* (Família Noctuidae), todas consideradas “pragas agrícolas” no Brasil. Diptera foi a segunda ordem com maior riqueza de espécies (nove) sendo representadas por 11 famílias e 12 gêneros. Hemiptera foi representada por duas famílias, um gênero e uma espécie. Hymenoptera foi representada por cinco famílias, cinco gêneros e três espécies. As ordens Blattodea, Orthoptera e Trichoptera tiveram a menor quantidade de táxons identificados, sendo uma família, um gênero e uma espécie identificados em cada ordem (Apêndice C). A classe Arachnida também foi identificada nas amostras com duas ordens, 03 famílias, três gêneros e duas espécies.

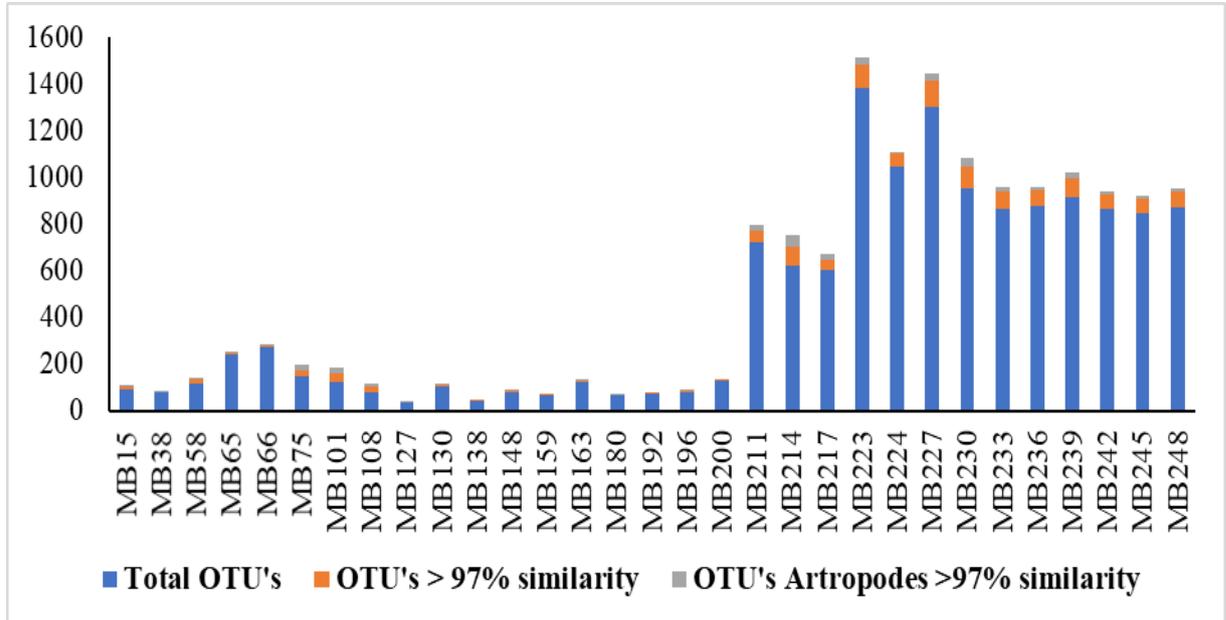
Dentre todas as amostras, Hemiptera foi a ordem que apresentou a maior frequência de ocorrência das OTUs (87,1%) (Apêndice C). A Ordem Diptera foi apresentada com a maior frequência de ocorrência nas cavidades N4E-23 (50,1%) e S11D-83 (57,2%), localizadas em Serra Norte e Serra Sul-Carajás-PA, respectivamente. As famílias Phoridae, Culicidae e Tachinidae apresentaram a mesma frequência de ocorrência (16,7%) para a cavidade N4E-23.

A Ordem Lepidoptera foi a mais frequente nas cavidades S11C-41 (58,4%) e N4WS-72 (72,6%), localizadas em Serra Sul e Serra Norte - Carajás-PA, respectivamente. As famílias mais frequentes de lepidópteros para a cavidade S11C-41 foram Noctuidae, Erebidae, Geometridae e Lymantriidae, com destaque para as OTUs indicativas para espécies de *Mocis latipes* (Noctuidae) e *Pleuroprucha asthenaria* (Geometridae). A cavidade N4WS-72 apresentou Crambidae, Noctuidae e Saturniidae como as famílias mais frequentes de lepidópteros, destacando-se as OTUs representativas para as espécies *Titanio tarraconensis*, *Mocis latipes* e *Pseudautomeris lata*, nesta ordem (Apêndice C). A Ordem Hemiptera obteve as maiores frequências de ocorrência nas cavidades S11B-94 (Serra Sul – Carajás - PA) (46,6%), SB-62 (Serra da Bocaina – PA) (87,1%), N4E-22 (47,2%) e Morro 2 – 99 (86,2), ambas em Serra Norte – Carajás - PA.

Lepidoptera foi a ordem com maior frequência de ocorrência (62,5%) na cavidade “Meu Rei” sendo Noctuidae a família com ocorrência mais frequente (48,7%) (Apêndice C). Apenas no mês de Outubro/2017 Lepidoptera não foi a ordem mais frequente, sendo Diptera e Hymenoptera as ordens representadas com maior número de OTUs (16 e 17 OTUs, respectivamente) (Figura 6).

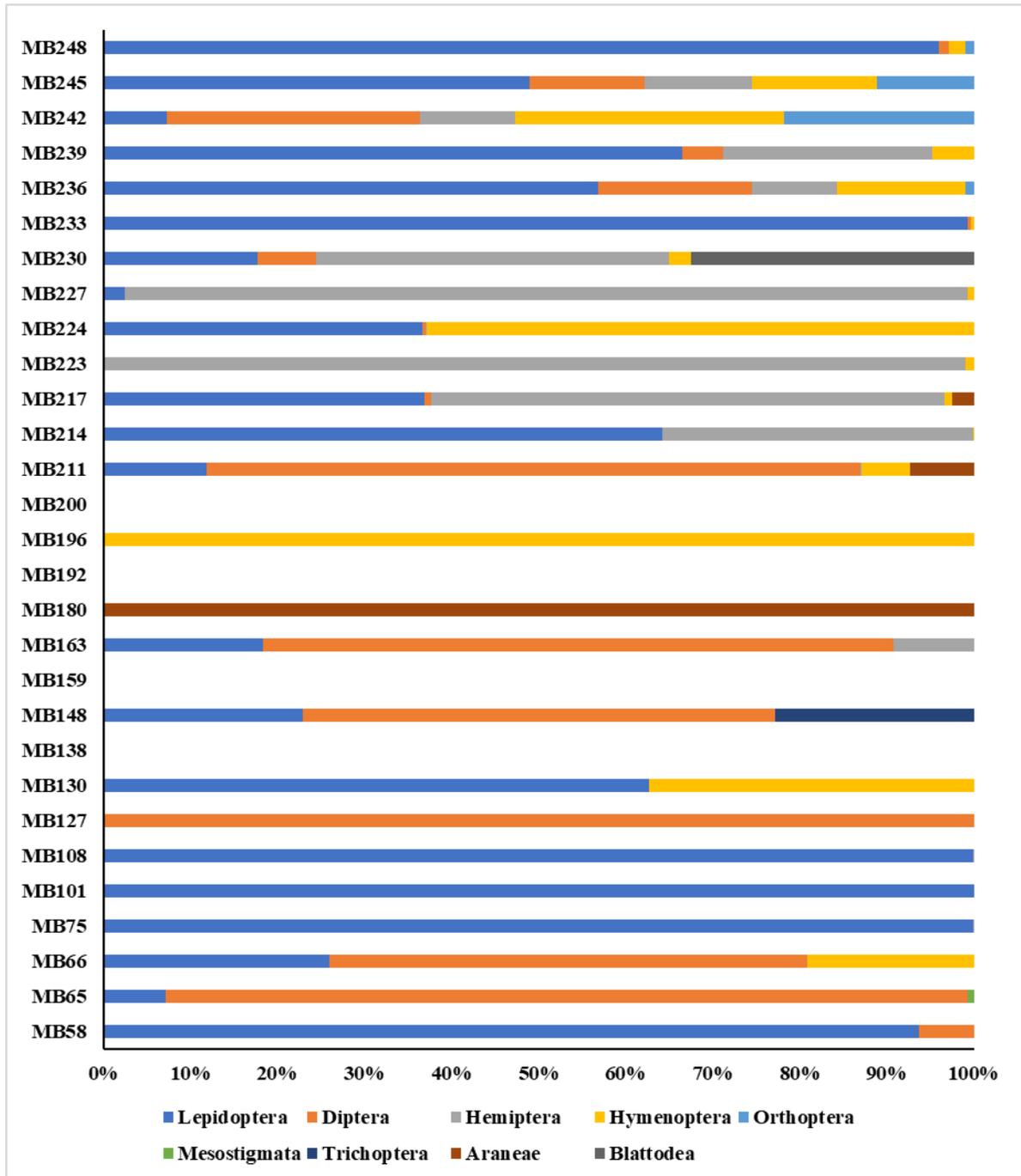
Lepidoptera, Diptera e Himenoptera foram as ordens com maior frequência de ocorrência, quando avaliado o conjunto de dados de todas as cavidades do complexo de cavernas de ferro de Carajás, Pará, Brasil, indicando 67458, 41616, 10412 OTUs representativas para as ordens, respectivamente (Figura 7).

Figura 4: Distribuição das OTUs encontradas após alinhamento das sequências com os bancos de dados de nucleotídeos do NCBI. Amostra de guano de morcegos insetívoros coletadas em ambientes cavernícolas da Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Caatinga, entre 2017 e 2018. Azul = total de OTUs alinhadas; laranja = OTUs com similaridade igual ou acima de 97%; verde = total de OTUs com similaridade igual ou acima de 97% para Artrópodes.



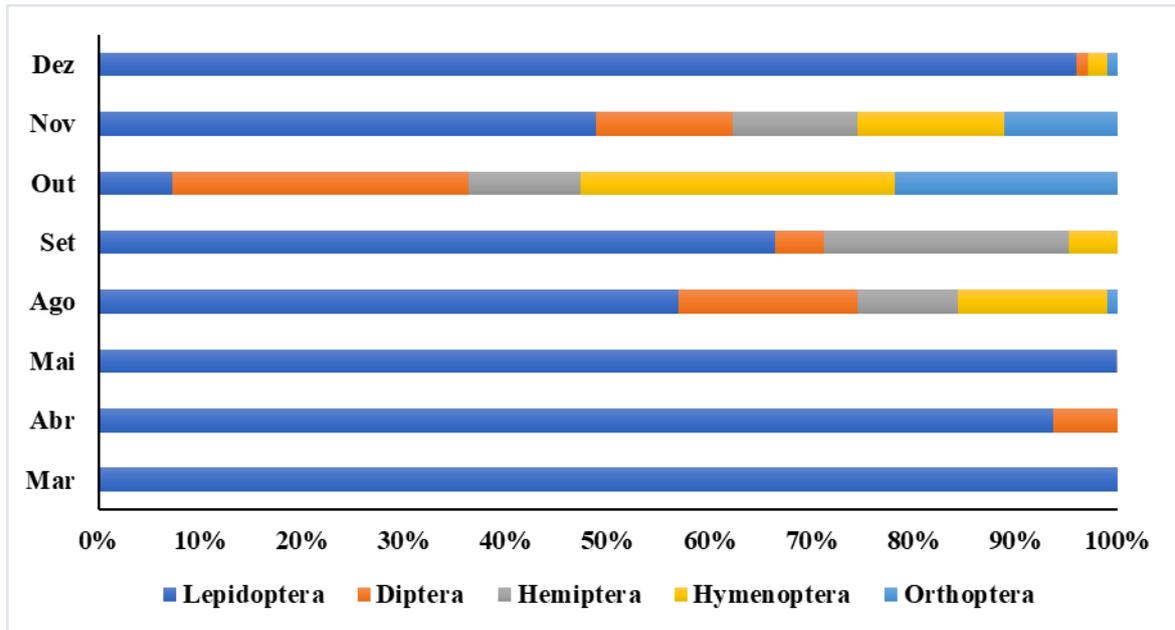
Fonte: A autora (2019).

Figura 5: Frequência de ocorrência (percentual de OTUs) das ordens de insetos presentes nas amostras de guano dos morcegos insetívoros. Amostras coletadas cavidades ferríferas do Complexo de Carajás, na Floresta Nacional de Carajás, e na Caverna “Meu Rei”, No PARNA Catimbau, durante os meses do ano de 2017 e 2018.



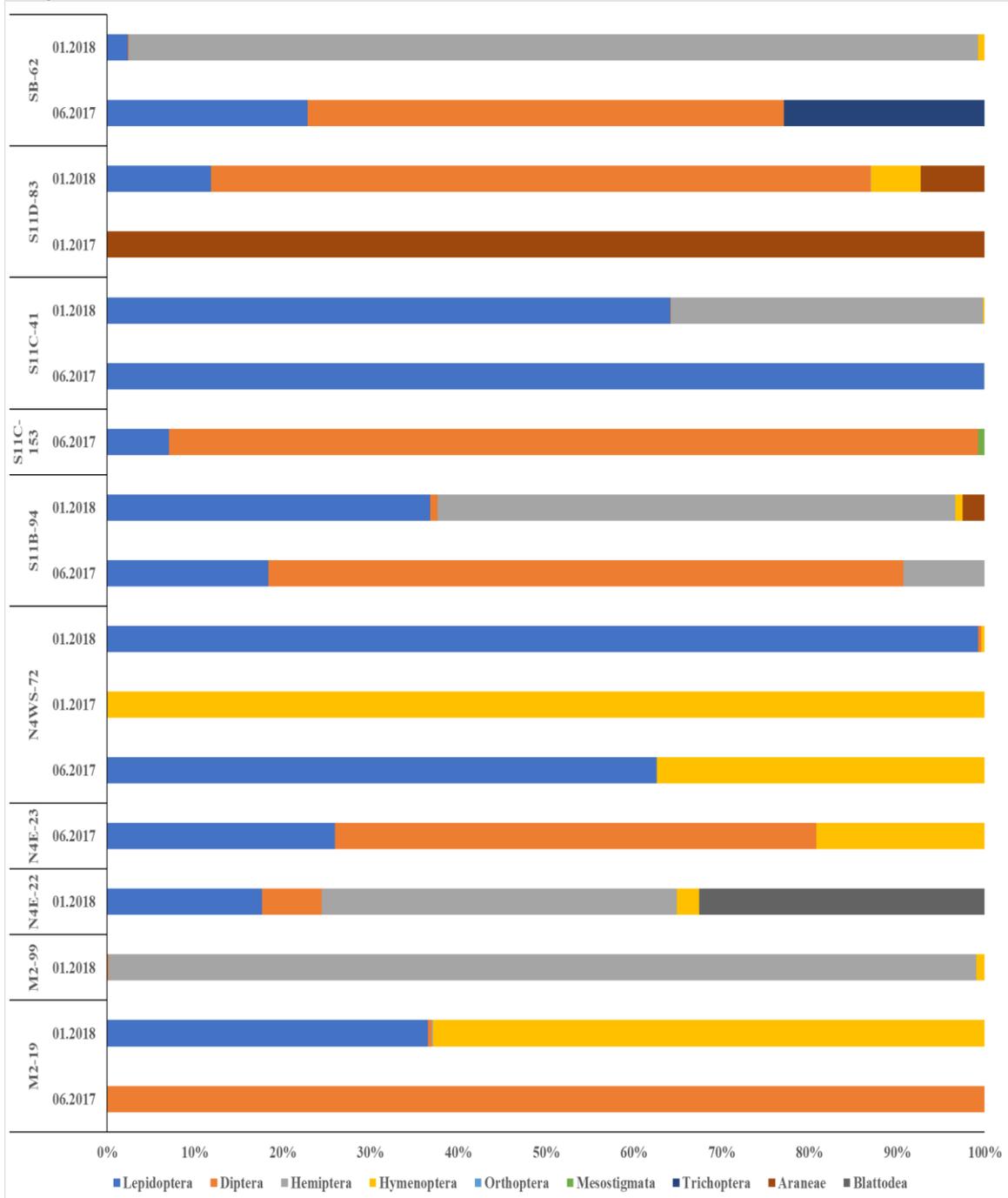
Fonte: A autora (2019).

Figura 6: Frequência de ocorrência (percentual de OTUs) das ordens de insetos na dieta dos morcegos insetívoros presentes nas amostras de guano coletadas na cavidade “Meu Rei”, no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil, durante alguns meses do ano de 2017.



Fonte: A autora (2019).

Figura 7: Frequência de ocorrência (percentual de OTUs) das ordens de insetos presentes na dieta dos morcegos insetívoros. Amostras de guano coletadas cavidades ferríferas do Complexo de Carajás, na Floresta Nacional de Carajás, Brasil, durante os meses do ano de 2017 e 2018.



Fonte: A autora (2019).

## 4 DISCUSSÃO

Em uma abordagem pioneira para o Brasil, este estudo utilizou a técnica de metabarcoding para acessar a riqueza e diversidade de táxons de artrópodes presentes na dieta de morcegos cavernícolas. As análises do guano proveniente de três diferentes ecossistemas indicaram a ocorrência de ao menos 382 unidades taxonômicas de artrópodes. Tal riqueza e diversidade confirmam a eficiência desta metodologia na identificação de itens alimentares e o importante papel desempenhado pelos morcegos na supressão de artrópodes.

Análises dos itens alimentares encontrados no guano de morcegos insetívoros vêm sendo realizadas por diversos autores há bastante tempo (*e.g.* AGUIAR & ANTONINI, 2008; BRACAMONTE, 2013; EMILIANO, et al, 2017; FENTON et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2015; KUNZ & WITHAKER, 1983). Contudo, a identificação em um nível detalhado é relativamente difícil caso seja realizada de forma tradicional, através da análise morfológica dos restos alimentares, devido à eficiente mastigação e digestão do alimento por morcegos (BARCLAY, DOLAN, DYCK, 1991), além de exigir um profundo conhecimento taxonômico para a identificação dos fragmentos encontrados nas fezes (CLARE et al., 2009). Diante disto, a utilização da técnica de metabarcoding, que permite a identificação taxonômica associada à tecnologia de sequenciamento de DNA de alto rendimento, faz com que a identificação destes itens alimentares possa ser ampliada (*e.g.* BOHMANN et al., 2011; CLARE et al., 2009, 2011, 2014; KUNZ et al, 2011; SALINAS-RAMOS et al., 2015). De fato, o presente estudo foi capaz de identificar as presas em níveis taxonômicos mais precisos e refinados, como gêneros ou espécies, enquanto as técnicas tradicionais morfológicas raramente fornecem as identificações além do nível de ordem ou família (CLARE et al., 2011; KUNZ; WHITAKER JR., 1983). Isto indica que a diversidade de itens alimentares consumidos por morcegos insetívoros quando acessada por meios tradicionais aponta para uma subestimativa tanto da riqueza, quanto da diversidade de itens alimentares efetivamente consumidos.

Além disso, a análise morfológica dos restos de insetos predados por algumas espécies de morcego acaba sendo enviesada (BOBROWIEC, 2007), registrando mais e melhor a riqueza de presas constituídas por partes duras, como coleópteros, e subestimando daquelas mais macias, como os lepidópteros, que podem ser totalmente digeridas e passarem despercebidas na identificação morfológica (CLARE et al., 2009, 2014; KUNZ; WHITAKER JR., 1983). De fato, o presente estudo foi capaz de identificar ao menos 33 unidades taxonômicas ao nível específico permitindo uma identificação precisa de espécies de insetos

que seriam de difícil – ou impossível – identificação caso fossem usados os métodos tradicionais de análise de fragmentos das partes duras dos insetos.

A melhor capacidade de identificação de partes moles também foi confirmada no presente estudo: lepidóptera foi a ordem com maior número de espécies encontradas (17), distribuídas em 20 gêneros e oito famílias, seguidos dos dípteros (nove espécies, 12 gêneros e 11 famílias), hymenópteros (três espécies, cinco gêneros e cinco famílias) e hemípteras (uma espécie, um gênero e duas famílias). BOHMANN et al. (2011), trabalhando com amostras fecais na Swazilândia, também encontraram resultados semelhantes: nas fezes do morcego molossídeo *Chaerophon pumilus* e *Mops condylurus* foram mais frequentes lepidópteros (52% e 47%, respectivamente) e dípteros (41% e 27%, respectivamente). Outras ordens de insetos, como coleóptera (< 2%), possuíram uma baixa frequência de ocorrência. Da mesma forma, CLARE et al. (2014), também utilizando a técnica molecular para verificar a dieta do vespertilionídeo *Myotis lucifugus* no Canadá, verificaram que Lepidoptera e Díptera foram as ordens mais frequentes (45% e 34%, respectivamente), e os coleópteros ocorreram com a menor frequência nas amostras (4%). Salinas-Ramos et al. (2015), quando analisando a dieta de três espécies de mormoopídeos no México, obtiveram 465 OTUS do guano de 192 indivíduos, sendo também Lepidoptera e Díptera as ordens de insetos mais consumidas.

#### **4.1 Serviços de supressão de insetos, incluindo “pragas agrícolas” e vetores de doenças**

A importância do papel desempenhado pelos morcegos na supressão de artrópodes vem sendo reconhecida nos últimos anos (e.g. BOHMANN et al., 2011; BOYLES et al., 2011; KUNZ et al., 2011; MASLO et al., 2017). Essa prestação de serviços ecossistêmicos ganha maior peso quando atrelada ao consumo de artrópodes herbívoros causadores de danos nas agriculturas – as chamadas “pragas agrícolas” – e também no consumo de insetos reconhecidos como vetores de doenças para humanos e outros animais. A supressão desses artrópodes pelos morcegos foi revisada por Kunz et al. (2011) e esse tipo de informação serve para estimar o valor econômico e ecológico da prestação desses serviços pelos morcegos em ambientes rurais e urbanos. Um estudo realizado por Whitaker (1995) nos Estados Unidos, baseando-se em informações de dieta, ecologia de forrageamento estimou que uma colônia de 150 indivíduos de *Eptesicus fuscus* consome aproximadamente 600.000 besouros, 158.000 gafanhotos e 335.000 percevejos por ano.

Baseando-se em amostras fecais e conteúdo estomacal de morcegos, estudos anteriores já detectaram artrópodes considerados pragas agrícolas, incluindo coleópteros das famílias Scarabidae e Elateridae, hemípteros da família Cicadellidae, e gafanhotos da família Delphacidae (KUNZ et al., 2011). Nos Estados Unidos, por exemplo, o morcego *Tadarida brasiliensis* é um predador da lagarta do cartucho do milho, *Helicoverpa zea* (CLEVELAND et al., 2006). Outras espécies, com potencial dano agrícola, já identificadas na dieta de morcegos insetívoros na América do Norte incluem besouros de junho (*Cotinis nitida*, Scarabidae), besouros clicadores (Elateridae), cigarrinhas (Cicadellidae), gafanhotos (Delphacidae), o besouro do pepino manchado (*Diabrotica undecimpunctata*, Chrysomelidae) e o percevejo verde (*Acrosternum hilare*, Pentatomidae) (KUNZ et al., 2011).

No presente estudo, foram identificadas ao menos 10 espécies consideradas pragas agrícolas no Brasil. Dentre elas, destacam-se *Pyrausta panopealis* (Família Crambidae), é uma mariposa encontrada no mundo inteiro incluindo América, Austrália, Ásia e África e ataca plantações de menta e orégano (MAES, 2014). *Pleuroprucha asthenaria* (Família Geometridae), são lepidópteros generalistas, tanto nas espécies quanto nas partes das plantas consumidas e ataca, por exemplo, plantações de *Miconia ferruginata*, *Zeyera montana* (planta utilizada na produção de fármacos contra doenças dermatológicas), *Ouratea hexasperma* (“barbatimão” planta medicinal e nativa do Cerrado) (DINIZ & MORAIS, 2002; JACOME et al., 2001; SILVA et al., 2017), e *Mocis latipes* (Família Noctuidae) conhecida como lagarta dos capinzais, é uma mariposa praga de gramíneas que se alimenta de folhas de culturas como arroz, cana-de-açúcar, milho, amendoim, pastagens, dentre outros (LOURENÇÃO et al., 1982). De maneira similar, também foram encontradas nas amostras fecais analisadas espécies de insetos considerados como vetores de doenças no país, tais como *Anopheles oryzalimnetes*, *Anopheles triannulatus* e *Anopheles vagus*. Também identificado nas amostras, *Culex interfor* pode transmitir o vírus da encefalite equina e da febre do Nilo Ocidental. Estudos (DIBO et al., 2011). Aleyrodidae é uma família de hemípteros (percevejos) além de ser bem representada neste estudo, a maioria das espécies dessa família são fitófagas e se alimentam da parte inferior das folhas, representando uma importante praga na agricultura (OLIVEIRA et al., 2013). O díptero *Hydrotaea irritans* (Família Muscidae) possui importância econômica e de saúde pública, e pode causar a chamada mastite de verão através de uma infecção bacteriana em bovinos (CHIRICO et al., 1997). *Calliphora nigribarbis*, díptero da família Calliphoridae, é considerado um transmissor do vírus da gripe aviária no Japão (TSUDA et al., 2009). *Chrysomya chani*, também da família Calliphoridae, é um

díptero que possui importância forense, desde que eles são os primeiros a colonizar cadáveres humanos (SUKONTASON et al., 2018).

O serviço de supressão de algumas pragas agrícolas pelos morcegos representa uma economia bastante significativa no uso de defensivos agrícolas e foi recentemente estimado em cerca de US\$ 23 bilhões ao ano em um experimento nos EUA (BOYLES et al., 2011). Não por acaso, identificar e valorar os serviços ambientais prestados por morcegos é uma das ações mais importantes para a conservação deste grupo no Brasil (BERNARD et al., 2012). Os dados aqui apresentados vão de encontro à esta perspectiva e são importantes para estudos de valoração focados em morcegos no país, o que é extremamente indicado dado o impacto do agronegócio na economia brasileira. De maneira similar, a importância dos morcegos como supressores de vetores também foi demonstrada e aponta a necessidade de estudos futuros focados neste tipo de serviço ecossistêmico, dado o impacto que alguns destes insetos têm na transmissão de enfermidades (CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1994) para a população brasileira.

#### **4.2 Aspectos metodológicos**

Apesar de suas vantagens, ainda existem limitações no uso da técnica de metabarcoding para fins de identificação de dieta de animais. Entre elas estão: (i) a ausência de padronização de protocolos das análises moleculares que preservem o material biológico de contaminantes ambientais; (ii) a dificuldade de obtenção de fragmentos de DNA de boa qualidade e em grande quantidade; (iii) a necessidade de um banco de dados prévio para a comparação e identificação dos itens alimentares.

Neste estudo, a falta de protocolos fez com que fossem necessários testes para identificar a técnica para a coleta e estocagem de material fecal oriundo de morcegos. Geralmente, amostras frescas são melhores para realizar as extrações de DNA, evitando a degradação potencial das amostras devido à influência da temperatura, do tempo decorrido, da contaminação por microrganismos e da atuação de inibidores de PCR (BRINKMAN et al., 2010; BOSTON et al., 2012; PASTOR-BEVIÁ et al., 2014; PUECHMAILLE & TEELING, 2014). No entanto, muitas vezes é impraticável realizar os procedimentos de extração imediatamente após coleta de amostras, além de, em alguns casos, ser desejável guardar amostras para futuras análises. Diante disto, foi verificado que o congelamento de amostras *in natura* é o método mais eficiente para armazenamento do guano de morcegos, por permitir a extração de uma maior quantidade de DNA das amostras em todos os ambientes analisados.

Tal constatação indica que, uma vez coletado, o eDNA pode ser armazenado por longos períodos, fornecendo uma biblioteca de amostras materiais que pode ser acessada em qualquer época para novas análises (LEAR et al., 2018).

Perante o grande número de métodos de armazenamento, extração, amplificação e sequenciamento de DNA de amostras ambientais e também para evitar enviesamentos nos resultados, além de torna-los comparáveis, faz-se necessária a padronização dos protocolos utilizados nos procedimentos moleculares (ALBERDI et al., 2018; LEAR et al., 2018). A padronização dos procedimentos moleculares para estudos de metabarcoding de eDNA deve ser testada em quaisquer estudos de investigações iniciais, principalmente com amostras oriundas da América do Sul e da África, onde esses estudos são escassos e não existem protocolos padronizados para este tipo de análise (LEAR et al., 2018).

Deve-se considerar que devido ao processo de digestão, a maioria das amostras de eDNA é constituída de pequenos fragmentos (DEAGLE; EVESON; JARMAN, 2006; KING et al., 2008), o que faz com que a escolha dos *primers* e da região do genoma analisada sejam de fundamental importância para a obtenção de resultados positivos (BOBROWIEC et al., 2015). Neste contexto, para encontrar os táxons presentes na dieta dos morcegos insetívoros, neste estudo foi utilizado um primer universal que amplifica um fragmento de 130 pb, presente no gene mitocondrial COI (FOLMER et al., 1994; ZHANG; HEWITT, 1997). Em contraste com o DNA nuclear, este marcador mitocondrial foi selecionado por apresentar um maior número de cópias por célula (KING et al., 2008) e por se tratar de um gene mais variável, permitindo distinguir táxons até mesmo ao nível de espécies. Quando comparado a outros marcadores (*e.g.* DEAGLE et al., 2014), é preferível o uso do COI nos estudos de metabarcoding dietético pela existência de um banco de dados de referência bem desenvolvido, que geralmente permite a identificação ao nível específico (KING et al., 2008). Em contrapartida, os primers utilizados neste estudo não detectaram com alta similaridade os táxons pertencentes aos indivíduos da ordem coleóptera. Isso pode ter acontecido por duas razões que precisam de estudo futuros: inespecificidade dos *primers* para a ordem Coleoptera; ou uma maior lacuna de presença de sequências desta ordem nos bancos de dados.

Outra limitação do uso de metabarcoding para fins de identificação de itens alimentares na dieta de morcegos está na escassez de sequências nos bancos de dados, o que impede, em vários casos, uma identificação mais eficiente (KING et al., 2008). No presente estudo, considerando um patamar de mais 97% de similaridade das sequências com o bancos de dados, as porcentagens de OTUs identificadas para artrópodes variaram entre 8 e 31%.

Contudo, acredita-se que tais porcentagens seriam mais altas caso os bancos de dados de nucleotídeos contemplassem uma maior quantidade e diversidade de organismos. Assim, estes resultados apontam para uma lacuna de conhecimento no Brasil no que diz respeito ao patrimônio genético de sua diversidade biológica.

Ainda assim, as técnicas moleculares abrem novos horizontes em relação ao melhor entendimento de composição e riqueza de dieta, estruturação de cadeias alimentares, fluxo de energia e relações tróficas (*e.g.* BOHMANN et al., 2011; CLARE et al., 2014; KUNZ et al., 2011; MASLO et al., 2017; TAYLOR et al., 2018). Este estudo comprovou, por exemplo, que a dieta de morcegos insetívoros cavernícolas é bem mais diversa do que imaginado. Sendo assim, dados como os aqui apresentados abrem um leque de possibilidades de futuros estudos para se investigar a dieta de morcegos insetívoros em diferentes ambientes no Brasil utilizando técnicas moleculares. Tais estudos podem abordar aspectos relacionamentos predador-presa, particionamento de recursos por espécies simpátricas, além da já citada quantificação dos serviços ecossistêmicos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da dieta dos morcegos insetívoros em ambientes cavernícolas através de metabarcoding mostrou a caracterização dos itens alimentares em níveis taxonômicos mais refinados, como famílias, gêneros e espécies. O uso dessa técnica no Brasil ainda apresenta desafios como a insuficiência de sequências de insetos neotropicais disponíveis nos bancos de dados, e o valor dos reagentes (desde a extração até o sequenciamento do DNA), que embora estejam mais acessíveis, ainda custam um valor mais alto do que as análises morfológicas tradicionais. Além disso, a padronização das metodologias moleculares continua uma etapa importante na obtenção de bons resultados, assim como o desenvolvimento de *primers* capazes de detectar os táxons em níveis de maior diferenciação, bem como o melhoramento dos pipelines de bioinformática. Ainda assim, os resultados obtidos com esta técnica compensam os eventuais empecilhos. A diversidade dos itens alimentares encontradas na dieta dos morcegos insetívoros reforça a capacidade desses animais na prestação dos serviços ecossistêmicos, principalmente quando suprimem artrópodes que podem causar prejuízos à agricultura e outros que podem ser transmissores de doenças. Sendo assim, os resultados aqui obtidos apontam o importante potencial da prestação de serviços ecossistêmicos prestados pelos morcegos no Brasil, e novas investigações sobre este assunto precisam ser estimuladas.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Ludmilla; ANTONINI, Yasmine. Diet of two sympatric insectivores bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Cerrado of Central Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 1, p. 28-31, 2008.
- ALBERDI, Antton et al. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 134-147, 2018.
- ANDÚJAR, Carmelo et al. Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 20, p. 3968-3975, 2018.
- ARRIZABALAGA-ESCUADERO, Aitor et al. Assessing niche partitioning of co-occurring sibling bat species by DNA metabarcoding. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 5, p. 1273-1283, 2018.
- AZEVEDO, Ítalo Silva; BERNARD, Enrico. Avaliação do nível de relevância e estado de conservação da caverna “meu rei” no Parna Catimbau, Pernambuco. **Revista Brasileira de Espeleologia**, v. 1, n. 5, 2015.
- BARCLAY, Robert MR; DOLAN, Mary-Anne; DYCK, Alvin. The digestive efficiency of insectivorous bats. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 7, p. 1853-1856, 1991.
- BECK, Andres. Fecal analyses of European bat species. **Myotis**, v. 32, n. 33, p. 109-119, 1995.
- BERNARD, Enrico et al. Uma análise de horizontes sobre a conservação de morcegos no Brasil. **Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação**, v. 2, p. 19-35, 2012.
- BETZHOLTZ, Per-Eric; FRANZÉN, Markus. Ecological characteristics associated with high mobility in night-active moths. **Basic and applied ecology**, v. 14, n. 3, p. 271-279, 2013.
- BEZERRA et al. **Plano de pesquisa geossistemas ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás**. Brasília : ICMBIO, 2017.
- BINCHENG, Zhang et al. **Index of economically important Lepidoptera**. 1994.
- BOBROWIEC, Paulo Estefano D.; LEMES, Maristerra R.; GRIBEL, Rogério. Prey preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*, Chiroptera) using molecular analysis. **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. 1, p. 54-63, 2015.
- BOBROWIEC, Paulo Estefano Dineli. **Caracterização molecular da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (MAMMALIA: CHIROPTERA) na Amazônia Brasileira**. 2007.
- BOHMANN, Kristine et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. **Trends in ecology & evolution**, v. 29, n. 6, p. 358-367, 2014.
- BOHMANN, Kristine et al. Molecular diet analysis of two African free-tailed bats (*Molossidae*) using high throughput sequencing. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21441, 2011.
- BOSTON, Emma SM et al. Empirical assessment of non-invasive population genetics in bats: comparison of DNA quality from faecal and tissue samples. **Acta Chiropterologica**, v. 14, n. 1, p. 45-52, 2012.

BOYLES, Justin G. et al. Economic importance of bats in agriculture. **Science**, v. 332, n. 6025, p. 41-42, 2011.

BRACAMONTE, Julio Cesar. Hábitos alimenticios de un ensamble de murciélagos insectívoros de bosque montano en las yungas argentinas. **Chiroptera Neotropical**, v. 19, n. 1, p. 1157-1162, 2013.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. **Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2001. p.11-128. Brasília : UNB, 2003.

BRINKMAN, Todd J. et al. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1547-1552, 2010.

BUCHLER, Edward R. Prey selection by *Myotis lucifugus* (chiroptera: vespertilionidae). **The American Naturalist**, v. 110, n. 974, p. 619-628, 1976.

CARVALHO, Fernando; DA CRUZ-NETO, Ariovaldo P.; ZOCCHÉ, Jairo J. Ampliação da distribuição e descrição da dieta de *Mimon bennettii* (Phyllostomidae, Phyllostominae) no sul do Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 14, n. 2, p. 403-408, 2008.

CATALOGUE OF LIFE. Annual Checklist Interface v1.9 r2126ab0 desenvolvido por Naturalis Biodiversity Center. Disponível em: <  
<http://www.catalogueoflife.org/col/browse/classification/kingdom/Animalia/phylum/Chordata/class/Mammalia/order/Chiroptera/fossil/1/match/1> >. Acesso em: 05 janeiro 2019.

CHIRICO, J. et al. "Summer mastitis experimentally induced by *Hydrotaea irritans* exposed to bacteria". **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 187–192, 1997.

CLARE, E. L. et al. Eating local: influences of habitat on the diet of little brown bats (*Myotis lucifugus*). **Molecular Ecology**, v. 20, n. 8, p. 1772-1780, 2011.

CLARE, Elizabeth L. et al. Species on the menu of a generalist predator, the eastern red bat (*Lasiurus borealis*): using a molecular approach to detect arthropod prey. **Molecular ecology**, v. 18, n. 11, p. 2532-2542, 2009.

CLARE, Elizabeth L. et al. The diet of *Myotis lucifugus* across Canada: assessing foraging quality and diet variability. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 15, p. 3618-3632, 2014.

CLARE, Elizabeth L. et al. The effects of parameter choice on defining molecular operational taxonomic units and resulting ecological analyses of metabarcoding data. **Genome**, v. 59, n. 11, p. 981-990, 2016.

CLARE, Elizabeth L. Molecular detection of trophic interactions: emerging trends, distinct advantages, significant considerations and conservation applications. **Evolutionary applications**, v. 7, n. 9, p. 1144-1157, 2014.

CLARE, E. L.; SYMONDSON, W.O.C.; FENTON, M.B.. "An inordinate fondness for beetles? Variation in seasonal dietary preferences of night-roosting big brown bats (*Eptesicus fuscus*)." **Molecular Ecology**. V. 23, n. 15, p. 3633-3647, 2014.

CLARKE, Laurence J. et al. Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 6, p. 1160-1170, 2014.

- CLEVELAND, Cutler J. et al. Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 4, n. 5, p. 238-243, 2006.
- CONSOLI, Rotraut AGB; DE OLIVEIRA, Ricardo Lourenço. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 1994.
- COSTA, Wilian França et al. Bat diversity in Carajás National Forest (Eastern Amazon) and potential impacts on ecosystem services under climate change. **Biological Conservation**, v. 218, p. 200-210, 2018.
- COSTANZA, Robert et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253, 1997.
- COUTTS, R. A.; FENTON, M. B.; GLEN, E. Food intake by captive *Myotis lucifugus* and *Eptesicus fuscus* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Journal of Mammalogy**, v. 54, n. 4, p. 985-990, 1973.
- CULLINEY, Thomas W. Crop losses to arthropods. In: **Integrated pest management**. Springer, Dordrecht, p. 201-225, 2014.
- DAILY, Gretchen. What are ecosystem services. **Global environmental challenges for the twenty-first century: Resources, consumption and sustainable solutions**, p. 227-231, 2003.
- DEAGLE, Bruce E. et al. DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. **Biology letters**, v. 10, n. 9, p. 20140562, 2014.
- DE-SOUZA, M. T. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose. **Técnicas básicas em biologia molecular. Brasília: UNB**, p. 11-128, 2003. DIAS et al., 2015.
- DIBO, Margareth Regina et al. Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 496-503, 2011.
- DIETZ, Christian; NILL, Dietmar; VON HELVERSEN, Otto. **Bats of Britain, Europe and Northwest Africa**. A & C Black, 2009.
- DINIZ, I.R., MORAIS, H.C. Local pattern of host plant utilization by lepidopteran larvae in the cerrado vegetation, **Entomotropica**, v. 17, n. 2, p. 115-119, 2002.
- DOS REIS, Nelio R. et al. (Ed.). **Morcegos do Brasil**. Univesidade Estadual de Londrina, 2007.
- DUCUMMON, Sheryl L. Ecological and economic importance of bats. **Bat Conservation International: Austin, TX**, 2000.
- EMILIANO, Sara Bandeira et al. Dieta de morcegos insetívoros (Mammalia: Chiroptera) em fragmentos de Floresta de Araucárias, no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 18, n. 3, 2017.
- EWING, Brent et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.
- FEDERICO, Paula et al. Brazilian free-tailed bats as insect pest regulators in transgenic and conventional cotton crops. **Ecological Applications**, v. 18, n. 4, p. 826-837, 2008.

- FENTON, M. B.; MORRIS, G. K. Opportunistic feeding by desert bats (*Myotis* spp.). **Canadian Journal of Zoology**, v. 54, n. 4, p. 526-530, 1976.
- FENTON, M. Brock et al. The diet of bats from Southeastern Brazil: the relation to echolocation and foraging behaviour. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 4, p. 1081-1085, 1999.
- FENTON, M. Brock. Bats. Facts on file. Inc., **New York**, 1992.
- FENTON, M. Brock; SIMMONS, Nancy B. Bats: a world of science and mystery. **University of Chicago Press**, 2015.
- FERREIRA, RL. **A medida da complexidade ecológica e suas aplicações na conservação e manejo de ecossistemas subterrâneos**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 158 pp, 2014.
- FLEMING, Theodore H.; HEITHAUS, E. Raymond. Frugivorous bats, seed shadows, and the structure of tropical forests. **Biotropica**, p. 45-53, 1981.
- FOLMER, O et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-9, 1994.
- FREEMAN, Patricia W. Correspondence of food habits and morphology in insectivorous bats. **Journal of Mammalogy**, v. 62, n. 1, p. 166-173, 1981.
- FREEMAN, Patricia Waring. Specialized insectivory: beetle-eating and moth-eating molossid bats. **Journal of Mammalogy**, v. 60, n. 3, p. 467-479, 1979.
- GHANEM, Simon J.; VOIGT, Christian C. Increasing awareness of ecosystem services provided by bats. In: **Advances in the Study of Behavior**. Academic Press, p. 279-302, 2012.
- GNASPINI, P. Bat guano ecosystems. A new classification and some considerations, with special references to Neotropical data. **Mémoires de Biospéologie**, v. 19, p. 135-138, 1992.
- HANDELSMAN, Jo. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.
- HILL, Dennis S. **Pests of crops in warmer climates and their control**. Springer Science & Business Media, 2008.
- ILLUMINA. **MiniSeq System - Specification Sheet: Sequencing**. 2016. Disponível em: <<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/miniseq-system-specification-sheet-770-2015-039.pdf>>. Acessado em 14 janeiro 2019.
- ILLUMINA. **An introduction to Next-Generation Sequencing Technology**. 2017 Disponível em: <[www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html](http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html)>. Acessado em 14 janeiro 2019.
- ILLUMINA. **Nextera XT DNA Library Prep Kit - Reference Guide**. 2018. Disponível em : <[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-03.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-03.pdf)>. Acessado em 14 janeiro 2019.

- JÁCOME, R. L. R. P. et al. Estudo químico de *Zeyheria montana* M.(bolsa-de-pastor). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 5-12, 2001.
- JONES, Gareth; TEELING, Emma C. The evolution of echolocation in bats. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 3, p. 149-156, 2006.
- KALCOUNIS-RUEPPELL, M. C. et al. Effects of wastewater treatment plant effluent on bat foraging ecology in an urban stream system. **Biological Conservation**, v. 138, n. 1-2, p. 120-130, 2007.
- KASSO, Mohammed; BALAKRISHNAN, Mundanthra. Ecological and economic importance of bats (Order Chiroptera). **ISRN Biodiversity**, v. 2013, 2013.
- KING, R. A. et al. INVITED REVIEW: Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. **Molecular ecology**, v. 17, n. 4, p. 947-963, 2008.
- KUNZ, T.H. & E.D. PIERSON. Bats of the World: an introduction, p. 1-46. In: R.W. NOWAK (Ed.). **Walker's bats of the World**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 287p, 1994.
- KUNZ, Thomas H. et al. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1-38, 2011.
- KUNZ, Thomas H.; WHITAKER JR, John O. An evaluation of fecal analysis for determining food habits of insectivorous bats. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, n. 6, p. 1317-1321, 1983.
- LADLE, Richard J. et al. Unexplored diversity and conservation potential of Neotropical hot caves. **Conservation Biology**, v. 26, n. 6, p. 978-982, 2012.
- LANZA B. Fauna d'Italia. Mammalia V. Chiroptera. **Calderini Editore**, Bologna, v. 47, 2012.
- LEÃO, T. C. C.; LÔBO, D.; DA SILVA, E.J. conservação, geologia e levantamento da fauna de invertebrados associados ao guano da caverna do urubu (SE-10), Divina Pastora, Sergipe. **XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia**. 2007.
- LEAR, G., et al. Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. **New Zealand Journal of Ecology**, v 42, n 1, p. 10–50, 2018.
- LOBOVA, T. A.; MORI, S. A. Checklist of species dispersed by bats in central French Guiana. **The New York Botanical Garden**. Consultado en <http://sciweb.nybg.org/science2>, 2005.
- LONG, R. et al. Bats feed on crop pests in Sacramento Valley. **California Agriculture**, v. 52, n. 1, p. 8-10, 1998.
- LOURENÇÃO, André Luiz; BERTI FILHO, Evôneo; FERRAZ, Maria Clarice Vasconcelos Dias. Inimigos naturais de *Mocis latipes* (Guenée, 1852) Natural enemies of *Mocis latipes* (Guenée, 1852). **Bragantia**, v. 41, n. 1, p. 237-240, 1982.
- MAES, 2014. Notes on the Crambidae of Africa with new synonyms and combinations (Lepidoptera Pyraloidea Crambidae). **Lambillionea CXIV**, v. 2, p.139-143, 2014.

- MARRERO, Patricia et al. Extraction of high-quality host DNA from feces and regurgitated seeds: a useful tool for vertebrate ecological studies. **Biological Research**, v. 42, n. 2, p. 147-151, 2009.
- MASLO, Brooke et al. Chirosurveillance: The use of native bats to detect invasive agricultural pests. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0173321, 2017.
- MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. **Island Press**, Washington, DC. 2005.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agropecuária puxa o PIB de 2017. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017> >. Acessado em: 14 janeiro 2019.
- MONTEIRO, Leandro R.; NOGUEIRA, Marcelo R. Evolutionary patterns and processes in the radiation of phyllostomid bats. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 137, 2011.
- NEW, T. R. Moths (Insecta: Lepidoptera) and conservation: background and perspective. **Journal of Insect Conservation**, v. 8, n. 2-3, p. 79-94, 2004.
- OGRAM, Andrew; SAYLER, Gary S.; BARKAY, Tamar. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of microbiological methods**, v. 7, n. 2-3, p. 57-66, 1987.
- OLIVEIRA, C. M. et al. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, n. 1-2, p. 1-15, 2013.
- OLIVEIRA, Leonardo Queiroz et al. Activity of the insectivorous bat *Pteronotus parnellii* relative to insect resources and vegetation structure. **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. 5, p. 1036-1044, 2015.
- PANARO, Nicholas J. et al. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. **Clinical chemistry**, v. 46, n. 11, p. 1851-1853, 2000.
- PASTOR-BEVIÁ, David et al. A molecular approach to the study of avian DNA in bat faeces. **Acta Chiropterologica**, v. 16, n. 2, p. 451-460, 2014.
- PEDRO, W. A. & TADDEI, V. A. Taxonomic assemblage of bats from Panga reserve, southeastern Brazil: abundance patterns and trophic relations in the Phyllostomidae (Chiroptera). **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. ser.)** v. 6, p. 3-21, 1997.
- POLLINI, A. **Entomologia Applicata**. Edagricole, Bologna (IT). 2013.
- POMPANON, F. et al. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 1931-1950, 2012.
- PROSSER, Sean WJ; HEBERT, Paul DN. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. **Food chemistry**, v. 214, p. 183-191, 2017.
- PUECHMAILLE, SJ, TEELING, EC. Non-invasive genetics can help find rare species: a case study with *Rhinolophus mehelyi* and *R. euryale* (Rhinolophidae: Chiroptera) in Western Europe. **Mammalia**. v.78, p. 251-255, 2014.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355-364, 2007.

- REIS, N. R. et al. Ordem Chiroptera. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO W. A.; LIMA, I. P. (Orgs.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina, p.153-230, 2006.
- RICCUCCI, M; LANZA, B. Bats and insect pest control: a review. **Vespertilio**. v. 17, p. 161-169, 2014.
- ROBIN, Jérôme D. et al. Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. **Scientific reports**, v. 6, p. 24067, 2016.
- SALINAS-RAMOS, Valeria B. et al. Dietary overlap and seasonality in three species of mormoopid bats from a tropical dry forest. **Molecular ecology**, v. 24, n. 20, p. 5296-5307, 2015.
- SAMARAKOON, T.; WANG, S. Y.; ALFORD, M. H. Enhancing PCR Amplification of DNA from Recalcitrant Plant Specimens Using a Trehalose-Based Additive. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1200236, 2013.
- SAMPAIO, E.M. et al. 2003. A biodiversity assessment of bats (Chiroptera) in a tropical lowland rainforest of central Amazonia, including methodological and conservation considerations. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 38, n. 1, p. 17-31, 2003.
- SANTANA, Sharlene E.; DUMONT, Elizabeth R. Do roost-excavating bats have stronger skulls? **Biological journal of the Linnean Society**, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2010.
- SCHMIEDER, Robert; EDWARDS, Robert. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17288, 2011.
- SILVA, Raullyan Borja Lima et al. "Uso e manejo de *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Baill var. *Planchonii* Engl. (barbatimão) na comunidade Vila Ressaca da Pedreira, Macapá, Amapá, Brasil" In: **Conhecimento e Manejo Sustentável da Biodiversidade Amapaense**. São Paulo: Blucher, p. 39 -60, 2017.
- SIMMONS, N. B., WILSON, D. AND REEDER, D. **Order chiroptera**. p. 312-529, in: *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson & D. M. Reeder, eds.) Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005.
- SIMMONS, Nancy B.; VOSS, Robert S. The mammals of Paracou, French Guiana, a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 1, **Bats**. **Bulletin of the AMNH**; no. 237. 1998.
- SOCIEDADE NORDESTINA DE ECOLOGIA (SNE). **Projeto Técnico para a Criação do Parque Nacional do Catimbau/PE. Subprojeto "Proposta para Criação do Parque Nacional do Catimbau/PE"**. p. 151, 2002.
- SUKONTASON, Kabkaew L. et al. *Chrysomya chani* Kurahashi (Diptera: Calliphoridae), a blow fly species of forensic importance: morphological characters of the third larval instar and a case report from Thailand. **Forensic Sciences Research**, v. 3, n. 1, p. 83-93, 2018.
- SUNDERLAND, KD; POWELL, W; SYMONDSON, W. **Populations and communities**. In: *Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective* (ed. Jervis MA), p. 299–434. Springer, Berlin, 2005.
- TABERLET, Pierre et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 2045-2050, 2012.
- TAYLOR, Peter John et al. Economic value of bat predation services—A review and new estimates from macadamia orchards. **Ecosystem Services**, v. 30, p. 372-381, 2018.

TEELING, Emma C. et al. Bat biology, genomes, and the Bat1K Project: To generate Chromosome-Level genomes for all living bat species. **Annual review of animal biosciences**, v. 6, p. 23-46, 2018.

TSUDA, Yoshio et al. Dispersal of a blow fly, *Calliphora nigribarbis*, in relation to the dissemination of highly pathogenic avian influenza virus. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 62, n. 4, p. 294-297, 2009.

VAUGHAN, N. The diets of British bats (Chiroptera). **Mammal Review**, v. 27, n. 2, p. 77-94, 1997.

WETTERER, Andrea L.; ROCKMAN, Matthew V.; SIMMONS, Nancy B. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. **Bulletin of the American Museum of Natural history**, p. 1-200, 2000.

WHITAKER JR, John O. Food of the big brown bat *Eptesicus fuscus* from maternity colonies in Indiana and Illinois. **American Midland Naturalist**, p. 346-360, 1995.

ZEALE, Matt RK et al. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 2, p. 236-244, 2011.

ZHANG, D.-X.; HEWITT, G. M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. **Insect Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 143-150, 1997.

ZHANG, Jiajie et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2013.

## APÊNDICE A

Metadados das Cavidades referentes às amostras de guano de morcegos insetívoros nos ambientes cavernícolas coletadas em Sergipe, Pernambuco e Pará e suas respectivas datas de coleta.

<b>Nome da cavidade</b>	<b>Localidade</b>	<b>Município</b>	<b>Estado</b>	<b>Coordenada geográfica (SIRGAS2000) Zona UTM 22</b>	<b>Datas das coletas</b>
Caverna do Urubu	Fazenda São José	Divina Pastora	SE	10°43'58.1"S 37°09'56.0"W	01/02/2017
Caverna Meu Rei	Parque Nacional (PARNA) Catimbau	PARNA inserido nos municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga	PE	08°29'14.1"S 37°16'48.8"W	16/03/2017 27/04/2017 27/05/2017 31/08/2017 20/09/2017 26/10/2017 24/11/2017 14/12/2017
N4WS-0072	Serra Norte	Parauapebas	PA	6°04'28.0"S 50°11'24.3"W	17/01/2017 28/06/2017 18/01/2018
N4E-0023	Serra dos Carajás	Parauapebas	PA	6°02'02.7"S 50°10'08.8"W	18/01/2017 27/06/2017 17/01/2018
S11D-83	Serra Sul	Canaã dos Carajás	PA	6°23'49.7"S 50°19'26.6"W	19/01/2017 19/06/2017 08/01/2018
S11B - 94	Serra Sul	Canaã dos Carajás	PA	6°20'56.7"S 50°23'36.5"W	20/06/2017 10/01/2018
S11C-41	Serra Sul	Canaã dos Carajás	PA	6°22'56.6"S 50°22'51.0"W	21/06/2017 09/01/2018
S11C-153	Serra Sul	Canaã dos Carajás	PA	6°22'04.1"S 50°23'22.3"W	22/06/2017 11/01/2018
SB -62	Serra da Bocaina	Canaã dos Carajás	PA	6°16'35.8"S 49°55'04.7"W	23/06/2017 13/01/2018
SB-85	Serra da Bocaina	Canaã dos Carajás	PA	6°18'44.6"S 49°52'59.4"W	24/06/2017

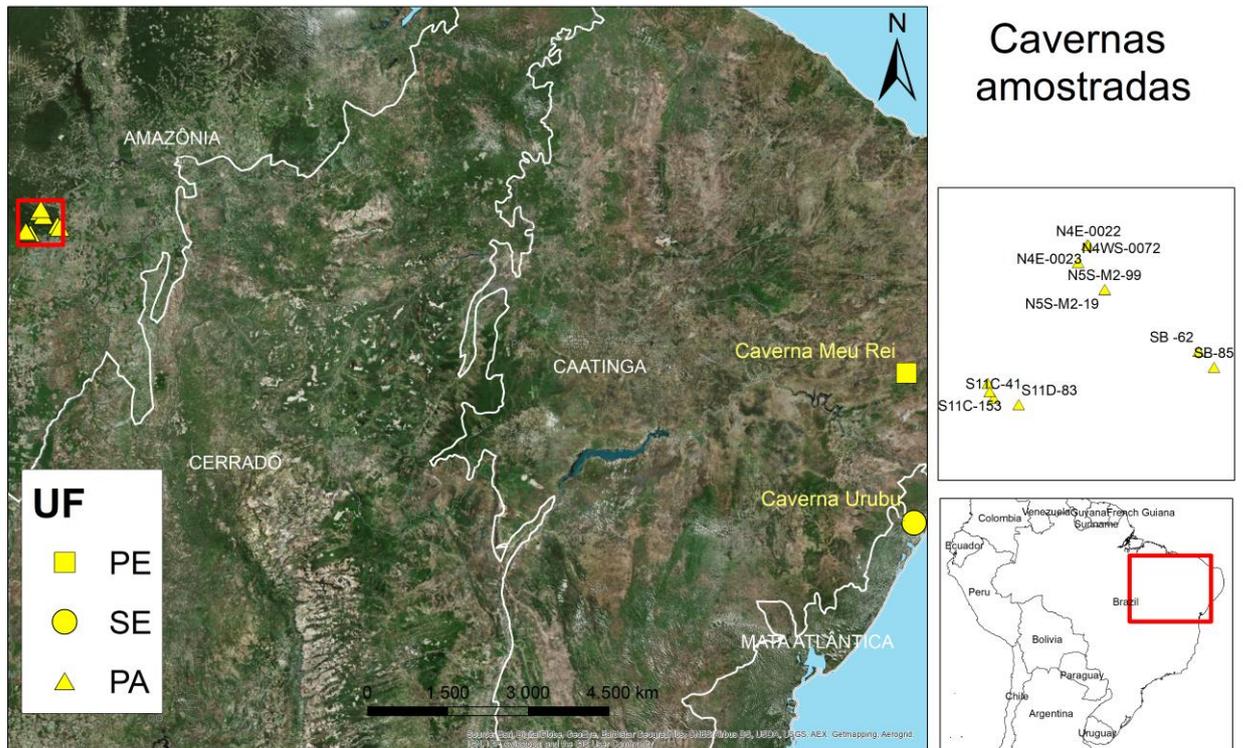
N5S-M2-19	Morro II - Serra Norte	Parauapebas	PA	6°08'10.1"S 50°07'47.6"W	26/06/2017 12/01/2018
N5S-M2-99	Morro II - Serra Norte	Parauapebas	PA	6°08'08.5"S 50°07'48.2"W	12/01/2018
N4E-0022	Serra Norte	Parauapebas	PA	6°02'08.4"S 50°09'58.6"W	29/06/2017 16/01/2018

---

Fonte: A Autora (2019).

## APÊNDICE B

Localização geográfica das cavidades em que o guano de morcegos insetívoros foi coletado, durante o período entre 2017 e 2018. A caverna do Urubu, localiza-se em Sergipe, nos domínios de Mata Atlântica. A caverna Meu Rei, localiza-se No PARNA Catimbau, inserido na Caatinga. E as cavidades da FLONA de Carajás, localizadas na Floresta Amazônica podem ser melhor localizadas no detalhe à direita superior do mapa principal.



Fonte: A Autora (2019).

## APÊNDICE C

Lista de táxons identificados a partir das amostras fecais de morcegos insetívoros através da análise de DNA, mostrando a cavidade de origem de coleta e a classificação taxonômica de cada táxon com similaridade com o banco de dados NCBI igual ou acima de 97%. Valor absoluto de OTUs geradas e frequência de ocorrência de cada OTU em cada amostra. As barras inseridas na coluna da Frequência de ocorrência ilustra a distribuição dos táxons. As amostras foram coletadas nas cavidade no período entre 2017 e 2018.

Cavidade	Ordem	Família	Gênero em destaque	Espécies em destaque	Número de OTU's com a presença da família*	Frequência de ocorrência de OTU's da família (%)	
Meu Rei - PE	Diptera	Tachinidae	<i>Eucelatoria</i>		1	0,9	
		Scathophagidae	<i>Delina</i>		5	4,3	
		Drosophilidae	<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila limensis</i>	8	7,0	
		Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>		5	4,3	
	Hemiptera	Aleyrodidae			14	12,2	
	Hymenoptera	Platygastridae			5	4,3	
		Mymaridae			1	0,9	
	Lepidoptera	Crambidae	<i>Hahncappsia</i>		2	1,7	
			<i>Pyrausta</i>	<i>Pyrausta panopealis</i>	2	1,7	
				<i>Pyrausta aurea</i>	1	0,9	
				<i>Samea</i>	<i>Samea multiplicalis</i>	3	2,6
		Geometridae	<i>Physocleora</i>		2	1,7	
		Noctuidae	<i>Mocis</i>	<i>Mocis latipes</i>	56	48,7	
			<i>Agrotis</i>	<i>Agrotis subterranea</i>	5	4,3	
		Pyralidae			1	0,9	
	Orthoptera	Gryllidae	<i>Gryllus</i>	<i>Gryllus pennsylvanicus</i>	4	3,5	
<b>Total</b>					<b>115</b>		

Cavidade	Ordem	Família	Gênero em destaque	Espécies em destaque	Número de OTU's com a presença da família*	Frequência de ocorrência de OTU's da família (%)
<b>N4E-23</b>	Diptera	Phoridae			1	16,7
		Culicidae	<i>Culex</i>	<i>Culex interfor</i>	1	16,7
		Tachinidae			1	16,7
	Hymenoptera	Platygastridae			1	16,7
	Lepidoptera	Geometridae	<i>Agathiopsis</i>	<i>Agathiopsis basipuncta</i>	1	16,7
		Noctuidae			1	16,7
<b>Total</b>				<b>6</b>		
<b>N4E-22</b>	Blattodea	Termitidae	<i>Atlantitermes</i>	<i>Atlantitermes oculatissimus</i>	2	5,6
	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>Anopheles triannulatus</i>	1	2,8
		Sciaridae			1	2,8
	Hemiptera	Aleyrodidae			17	47,2
	Hymenoptera	Apidae	<i>Epiclopus</i>	<i>Epiclopus wagenknechti</i>	1	2,8
		Mymaridae			1	2,8
	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Massala</i>	<i>Massala hieroglyphica</i>	1	2,8
			<i>Mocis</i>	<i>Mocis latipes</i>	12	33,3
	<b>Total</b>				<b>36</b>	

Cavidade	Ordem	Família	Gênero em destaque	Espécies em destaque	Número de OTU's com a presença da família*	Frequência de ocorrência de OTU's da família (%)
N4WS-72	Diptera	Scathophagidae	<i>Delina</i>		1	4,5
		Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>		1	4,5
	Hymenoptera	Ichneumonidae	<i>Enicospilus</i>		1	4,5
		Megachilidae	<i>Notanthidium</i>	<i>Notanthidium steloides</i>	1	4,5
			<i>Megachile</i>		1	4,5
	Lepidoptera	Platygastridae			1	4,5
		Crambidae	<i>Titanio</i>	<i>Titanio tarraconensis</i>	1	4,5
		Noctuidae	<i>Mocis</i>	<i>Mocis latipes</i>	14	63,6
Saturniidae		<i>Pseudautomeris</i>	<i>Pseudautomeris lata</i>	1	4,5	
<b>Total</b>				<b>22</b>		
M2-19	Diptera	Psychodidae			1	14,3
		Scathophagidae	<i>Delina</i>		1	14,3
		Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>		1	14,3
	Hemiptera	Aleyrodidae			1	14,3
	Hymenoptera	Mymaridae			2	28,6
		Platygastridae			1	14,3
<b>Total</b>				<b>7</b>		

Cavidade	Ordem	Família	Gênero em destaque	Espécies em destaque	Número de OTU's com a presença da família*	Frequência de ocorrência de OTU's da família (%)
M2-99	Diptera	Sciaridae			1	3,4
		Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>		1	3,4
	Hemiptera	Aleyrodidae			25	86,2
	Hymenoptera	Mymaridae			1	3,4
		Platygastridae			1	3,4
<b>Total</b>				<b>29</b>		
S11D-83	(Arachnida) Araneae	Araneidae	<i>Araneus</i>	<i>Araneus venatrix</i>	2	9,5
		Nephilidae	<i>Nephila</i>	<i>Nephila clavipes</i>	1	4,8
	Diptera	Aulacigastridae	<i>Aulacigaster</i>	<i>Aulacigaster neoleucopeza</i>	1	4,8
		Drosophilidae	<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila limensis</i>	8	38,1
		Muscidae	<i>Hydrotaea</i>	<i>Hydrotaea irritans</i>	2	9,5
	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>			1	4,8
		Aleyrodidae			1	4,8
	Hemiptera	Aleyrodidae			1	4,8
	Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus</i>	<i>Bombus czerskii</i>	1	4,8
	Lepidoptera	Erebidae	<i>Hormoschista</i>	<i>Hormoschista latipalpis</i>	1	4,8
		Noctuidae	<i>Massala</i>	<i>Massala hieroglyphica</i>	1	4,8
		Plutellidae	<i>Plutella</i>	<i>Plutella xylostella</i>	1	4,8
Noctuidae	<i>Renodes</i>	<i>Renodes curviluna</i>	1	4,8		
<b>Total</b>				<b>21</b>		

Cavidade	Ordem	Família	Gênero em destaque	Espécies em destaque	Número de OTU's com a presença da família*	Frequência de ocorrência de OTU's da família (%)
S11C-41	Diptera	Sciaridae			1	1,4
	Hemiptera	Aleyrodidae			28	38,9
	Hymenoptera	Mymaridae			1	1,4
	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Mocis</i>	<i>Mocis latipes</i>	33	45,8
			<i>Massala</i>	<i>Massala hieroglyphica</i>	1	1,4
			<i>Agyra</i>		1	1,4
		Erebidae	<i>Eulepidotis</i>	<i>Eulepidotis punctilinea</i>	1	1,4
			<i>Oxidercia</i>		1	1,4
		Geometridae	<i>Herbita</i>	<i>Herbita lilacina</i>	1	1,4
			<i>Pleuroprucha</i>	<i>Pleuroprucha asthenaria</i>	1	1,4
		<i>Phrygionis</i>		1	1,4	
	Lymantriidae			2	2,8	
<b>Total</b>				<b>72</b>		
S11C-153	(Arachnida) Mesostigmata	Blattisociidae			1	20
	Diptera	Tachinidae	<i>Houghia</i>		2	40
	Lepidoptera	Erebidae	<i>Oxidercia</i>		1	20
		Noctuidae	<i>Mocis</i>	<i>Mocis latipes</i>	1	20
<b>Total</b>				<b>5</b>		

Cavidade	Ordem	Família	Gênero em destaque	Espécies em destaque	Número de OTU's com a presença da família*	Frequência de ocorrência de OTU's da família (%)
<b>S11B-94</b>	(Arachnida) Araneae	Araneidae	<i>Araneus</i>	<i>Araneus venatrix</i>	1	3,3
	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	<i>Calliphora nigribarbis</i>	1	3,3
			<i>Chrysomya</i>	<i>Chrysomya chani</i>	1	3,3
			<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila limensis</i>	1	3,3
	Hemiptera	Coreidae	<i>Hypselonotus</i>	<i>Hypselonotus fulvus</i>	1	3,3
					1	3,3
	Hymenoptera	Aleyrodidae			13	43,3
					1	3,3
	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Mocis</i>	<i>Mocis latipes</i>	8	26,7
					1	3,3
1					3,3	
<b>Total</b>					<b>30</b>	
<b>SB-62</b>	Diptera	Muscidae	<i>Cyrtoneuropsis</i>	<i>Cyrtoneuropsis pararescita</i>	1	3,2
		Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>Anopheles oryzalimnetes</i>	1	3,2
				<i>Anopheles vagus</i>	1	3,2
		Scathophagidae	<i>Delina</i>		1	3,2
		Sciaridae			1	3,2
		Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>		1	3,2
	Hemiptera	Aleyrodidae			27	87,1
	Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus</i>	<i>Bombus czerskii</i>	1	3,2
		Mymaridae			1	3,2
		Platygastridae			1	3,2
	Lepidoptera	Pyalidae	<i>Hypsopygia</i>	<i>Hypsopygia nostralis</i>	1	3,2
		Noctuidae	<i>Mocis</i>	<i>Mocis latipes</i>	1	3,2
	Trichoptera	Hydrobiosidae	<i>Hydrobiosis</i>	<i>Hydrobiosis budgei</i>	1	3,2
<b>Total</b>					<b>39</b>	

Fonte: A autora (2019).

## ANEXO A

Detalhes dos procedimentos metodológicos referentes ao Pipeline de bionformática.

### 1. Análise de bioinformática

#### 1.1. Pipeline – Metabarcoding de COI

##Step 1 - At first, if the data need to be demultiplexed, you must prepare a barcode.txt file, in the following format:

```
BC01 CTAAGGTAACGAT
BC02 TAAGGAGAACGAT
BC03 AAGAGGATTCGAT
BC04 TACCAAGATCGAT
BC05 CAGAAGGAACGAT
BC06 CTGCAAGTTCGAT
BC07 CTGCAAGTTCGAT
BC08 TTCCGATAACGAT
BC09 TGAGCGGAACGAT
BC10 CTGACCGAACGAT
```

##Step 2 - Then, use the following command with the fastx\_barcode\_splitter.pl script:

```
cat SN1-44-ITS.fastq | fastx_barcode_splitter.pl --bcfile
barcodes.txt --prefix SN1-44_ITS_
--suffix .fastq --bol --exact
```

##Step 3 - Every adapter and barcode sequences of the output files from Step 2 need to be clipped; for i in \*.fastq; do newfile=&quot;\$(basename \$i .fastq)&quot;; echo working with \$i; python ~/ITV/Programas/BMP\_UPARSE\_Scripts/BMP\_UPARSE\_Scripts/fastq\_strip\_barcode\_relabel2.py \$i ATGCGATACTTGGTGTGAAT barcodes.fasta Ex &gt; \${newfile}\_clipped.fastq; done;

##Step 4 - Depending of the marker gene to be analyzed, you must choose among: qiime\_ITS\_v2.sh, qiime\_16S.sh, qiime\_COI.sh and run the following comand for each metabarcoding file generated in the Step 3: for i in \*.fastq; do dir=&quot;\$(basename \$i \_clipped.fastq)&quot;; echo \$dir; ~/ITV/Scripts/qiime\_ITS\_v2.sh \$i \$dir; done;

##Step 5 - If you are analyzing 16S or ITS genes, the standard Qiime pipeline may not need further analysis. But

```

COI and ITS (for other database usage) may need the
following analysis. Another OTU Table must be created:
for i in */; do dir="$(basename $i)"; echo $dir;
python /ITV/Scripts/createOtuTable.py ${i}/*_map.uc; done;

#Step 6 - Next, you need to blast the otus.fasta against
your reference database:
for i in */; do dir="$(basename $i)"; echo $dir;
mkdir ../blast/${dir}; cd $i; blastn -query
*_otus.fasta -task megablast -db
bio/share_bio/databases/barcode_itv/July2017/ITVBiobase.fast
a -max_target_seqs 1 - parse_deflines -num_threads 24 -
outfmt "6 qseqid sseqid stitle pident qcovs
evaluate" >
../../blast/${dir}/${dir}_blast.log; cd ../; done;

##Step 7 - With the final output from Blast and the new Otu
tables generated, you may run the following command to
obtain the final output, with the taxons and respective
abundances found in the data:
for i in */; do newfile="$(basename $i)"; echo
$newfile; python
~/ITV/Scripts/createTaxonTableCOI.py ${newfile}/*.log
../otu_tables/${newfile}_map.uc_otu_table.txt
${newfile}_out; done; newfile="$(basename $1
assembled.fastq) "

#Quality filtering and convert to FASTA

usearch9.0.2132_i86linux32 -fastq_filter ../$1 -fastq_maxee
0.5 -fastaout ${newfile}_clipped.fasta

#Change sequence header to make file compatible with further
UPARSE steps <<<USING BMP PERL SCRIPT>>>. This script will
generate your converted FASTA file

perl
~/ITV/Programas/BMP_UPARSE_Scripts/BMP_UPARSE_Scripts/bmp-
Qiime2Uparse.pl -i ${newfile}_clipped.fasta -o
${newfile}_uparse.fasta

#Dereplication <<<USING USEARCH 7>>>

```

```
usearch9.0.2132_i86linux32 -derep_fulllength
${newfile}_uparse.fasta -fastaout ${newfile}_derep.fasta -
sizeout

#Abundance sort and discard singletons <<<USING USEARCH 7>>>
usearch9.0.2132_i86linux32 -sortbysize
${newfile}_derep.fasta -fastaout ${newfile}_sorted.fasta -
minsize 2

# Shortening reads in the ITS extracted FASTA file <<<USING
USEARCH 8>>>
usearch9.0.2132_i86linux32 -fastx_truncate
${newfile}_sorted.fasta -trunclen 130 -fastaout
${newfile}_trimmed.fasta

#OTU clustering using UPARSE method <<<USING USEARCH 7>>>
usearch9.0.2132_i86linux32 -cluster_otus
${newfile}_trimmed.fasta -otus ${newfile}_otus1.fasta

#Chimera filtering using reference database <<<USING USEARCH
7>>>
#usearch9.0.2132_i86linux32 -mode high_confidence -
uchime2_ref ${newfile}_otus1.fasta -db
~/ITV/Programas/uchime_reference_dataset_01.12.2016/uchime_r
eference_dataset_01.12.2016.fasta -strand plus -notmatched
${newfile}_otus2.fasta

# Fasta Formatter <<<FASTX TOOLKIT SCRIPT>>>
fasta_formatter -i ${newfile}_otus1.fasta -o
${newfile}_formatted_otus2.fasta

#Renamer <<<BMP SCRIPT>>>
perl
~/ITV/Programas/BMP_UPARSE_Scripts/BMP_UPARSE_Scripts/bmp-
otuName.pl -i ${newfile}_formatted_otus2.fasta -o
${newfile}_otus.fasta
```

```
#Map reads back to OTU database <<<USEARCH7 script>>>

usearch9.0.2132_i86linux32 -usearch_global
${newfile}_uparse.fasta -db ${newfile}_otus.fasta -strand
both -id 0.97 -uc ${newfile}_map.uc

#Assign taxonomy to OTUS using blast method on QIIME. Use
the file .otus.fa. from UPARSE as input file and UNITE as
reference database (Download UNITE database HERE)

#assign_taxonomy.py -i ${newfile}_otus.fasta -o output -r
~/ITV/Programas/sh_refs_qiime_ver7/sh_refs_qiime_ver7_97_s_2
0.11.2016.fasta -t
~/ITV/Programas/sh_refs_qiime_ver7/sh_taxonomy_qiime_ver7_97
_s_20.11.2016.txt -m blast

#Convert UC to otu-table.txt <<< BMP SCRIPT>>>

python
~/ITV/Programas/BMP_UPARSE_Scripts/BMP_UPARSE_Scripts/bmp-
map2qiime.py ${newfile}_map.uc > ${newfile}_otu_table.txt

#Convert otu_table.txt to otu-table.biom <<< QIIME SCRIPT>>>

#make_otu_table.py -i ${newfile}_otu_table.txt -t
output/${newfile}_otus_tax_assignments.txt -o
${newfile}_otu_table.biom

# Check OTU Table on QIIME.

#biom summarize-table -i ${newfile}_otu_table.biom -o
${newfile}_biom_table

#Run diversity analyses on QIIME by applying non-
phylogenetic metrics
```