



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS PEDRO II
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANTONIO MATHEUS SANTOS DA SILVA

**DETECÇÃO DE DNA AMBIENTAL (eDNA) UTILIZANDO DIFERENTES
MEMBRANAS NA CACHOEIRA DO LAJEDO EM PEDRO II-PI, BRASIL**

PEDRO II - PI

2023

ANTONIO MATHEUS SANTOS DA SILVA

DETECÇÃO DE DNA AMBIENTAL (eDNA) UTILIZANDO DIFERENTES
MEMBRANAS NA CACHOEIRA DO LAJEDO EM PEDRO II-PI, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso (artigo científico)
apresentado como exigência parcial para obtenção
do diploma do Curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas do Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Pedro II.

Orientador: Profº. Drº. Willame Rodrigues do
Nascimento.

PEDRO II - PI

2023

ANTONIO MATHEUS SANTOS DA SILVA

DETECÇÃO DE DNA AMBIENTAL (eDNA) UTILIZANDO DIFERENTES
MEMBRANAS NA CACHOEIRA DO LAJEDO EM PEDRO II-PI

Trabalho de Conclusão de Curso (artigo) apresentado
como exigência parcial para obtenção do diploma do
Curso de licenciatura em ciências biológicas do
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
do Piauí, Campus – Pedro II.

Aprovado em: 11 / 01/ 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Willame Rodrigues do Nascimento Sousa

Instituto Federal do Piauí

Orientador

Profº. Dr. Rafael da Costa Almeida –Instituto Federal do Piauí

Membro Examinador interno

Dr. Geice Ribeiro da Silva

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

Membro Examinador Externo

DETECÇÃO DE DNA AMBIENTAL (eDNA) UTILIZANDO DIFERENTES MEMBRANAS NA CACHOEIRA DO LAJEDO EM PEDRO II-PI

Antonio Matheus Santos da Silva¹
Willame Rodrigues do Nascimento²

RESUMO

O DNA ambiental está presente em diversos ambientes como: água, ar e solo, sendo estes, liberado por diversos organismos. Seu estudo vem ganhando força ao longo do tempo, diversas pesquisas já foram realizadas na área, mesclando com outras áreas como Biologia molecular e genética, principalmente abordando pesquisas em ambientes aquáticos, sendo utilizado para identificação de espécies, otimizando os protocolos para ambientes diversos. O trabalho foi realizado na cachoeira do Lajedo localizada no município de Pedro II, Piauí, Brasil. O estudo em questão utilizou como auxílio para a realização da coleta um equipamento portátil, que foi desenvolvido com o propósito de facilitar e auxiliar a captura do DNA ambiental, contornando a limitação de coleta em áreas de difícil acesso. Testou se a capacidade de retenção de três tipos diferentes de membranas: nylon, polipropileno (filtro de café) e papel filtro, em ambientes de cachoeira para comprovar a eficácia de retenção de partículas pelas membranas. Com a captura das amostras celulares, as membranas foram colocadas em microtúbulos com solução tampão de lise e foram armazenadas em um isopor e levadas para análise em laboratório, onde testamos e desenvolvemos um protocolo de extração adequado para a forma de coleta que utilizamos no estudo. Após a extração o DNA extraído passou por corridas eletroforéticas em géis de agarose para visualizar a concentração e integridade do material. Concluimos com o estudo que as três membranas apresentaram capacidade para reter o DNA ambiental, apresentando sua visualização em gel de agarose, além da eficácia do equipamento desenvolvido.

Palavras-chave: Cachoeira; DNA ambiental; Equipamento portátil; Extração de eDNA; Método de coleta.

ABSTRACT

Environmental DNA is present in various environments such as: water, air and soil, which are released by various organisms. His study has been gaining strength over time, several studies have already been carried out in the area, merging with other areas such as molecular biology and genetics, mainly addressing research in aquatic environments, being used for species identification, optimizing protocols for different environments. The work was carried out at the Lajedo waterfall located in the municipality of Pedro II, Piauí, Brazil. The study in question used a portable equipment as an aid to carry out the collection, which was developed with the purpose of facilitating and assisting the capture of environmental DNA, bypassing the limitation of collection in areas of difficult access. The retention capacity of three different types of membranes was tested: nylon, polypropylene (coffee filter) and filter paper, in waterfall environments to prove the efficiency of particle retention by the membranes. With

¹ Graduando do curso em Ciências Biológicas. IFPI campus – Pedro II, PIAUÍ. matheussantosbio2019@gmail.com.

² Docente do Curso de Ciências Biológicas do INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA – campus Pedro II – PI. willame.rodrigues@ifpi.edu.br.

the capture of cell samples, the membranes were placed in microtubules with a lysis buffer solution and were stored in a polystyrene and taken to the laboratory for analysis, where we tested and developed an extraction protocol suitable for the collection method we used in the study. After extraction, the extracted DNA underwent electrophoretic runs on agarose gels to visualize the concentration and integrity of the material. We conclude with the study that the three membranes showed the capacity to retain environmental DNA, presenting its visualization in agarose gel, in addition to the effectiveness of the developed equipment.

Keywords: Collection method; Environmental DNA; eDNA extraction; Portable equipment; Waterfall.

Data de aprovação: 11/01/2023 (data de apresentação do TCC)

1 INTRODUÇÃO

O DNA ambiental (eDNA) qualifica-se por um complexo de misturas de DNA (ÁCIDO DESSOXIRIBONUCLEICO) nuclear, mitocondrial e de diferentes organismos (TABERLET *et al.*, 2012), agindo como uma espécie de “código de barras de DNA” (DNA *barcoding*), que podem ser empregados como códigos de barras de DNA para identificação dos organismos presentes na amostra de material ambiental, adicionando-se a esse termo a palavra “meta”, quando a identificação de várias espécies é proveniente de uma amostra única do DNA, esse recebe o nome de “*Metabarcoding*” (TABERLET *et al.*, 2012), se definindo como o DNA que foi liberado por um organismo em seu ambiente e que pode ser encontrado no ar, na água ou no solo (CARIM *et al.*, 2016).

O eDNA deriva não só de micróbios, mas sim de uma ampla gama de organismos, dentre eles organismos superiores como plantas e vertebrados (PEDESERSEN *et al.*, 2015). Em um estudo pioneiro de 2003, foram encontradas em sedimentos da Sibéria e da Nova Zelândia, vestígios de DNA de animais extintos, como mamutes peludos e pássaros moa (WILLERSLEV *et al.*, 2003), com os resultados do estudo teve-se a confirmação da presença do eDNA em diversos organismos, até mesmos em organismos que não se fossilizam, mais conseguem deixar vestígios do DNA extracelular em sedimentos. A primeira aplicação que se tem indício utilizando esse método em ambientes aquáticos, deu-se em 2008, onde decorreu da aplicação do método na identificação da espécie *Lithobates catesbeianus* (rã-touro americana), sendo que o presente estudo identificou essa espécie em regiões da França (FICETOLA *et al.*, 2008), fora de seu habitat de origem, caracterizando-a como uma espécie invasora, sendo uma das espécies mais ocorrentes na região.

Com a utilização do eDNA se torna possível identificar as diversas espécies animais, sem nem mesmo precisar vê-las, ouvi-las ou mesmo tira-las de seu habitat natural, preservando assim tanto o ambiente em que estão, como as espécies contidas nele. Conforme se faz o uso de métodos aplicando o eDNA, novos ares surgem, abrindo novas estratégias para o seu melhoramento, funcionalidade, ampliação e gestão ambiental (KELLY *et al.* 2014). Desenvolvendo por sua vez, novas maneiras para contornar sua degradação e os fatores que a influenciam, de forma a entender assim a sua origem e os fatores que influenciam sua produção (BURNES e TURNER, 2016). Com base nisto, para ter resultados satisfatórios quando se realiza coleta com eDNA é importante levar em conta três considerações para poder realizar pesquisas na área, que são: (i) a captura do material ambiental, (ii) sua preservação e (iii) a extração bem sucedida (PILLIOD *et al.*, 2013). Estudos anteriores comprovaram a eficácia de vários tipos de membranas de filtro e tamanho de poros das membranas (MINAMOTO *et al.*, 2012; THOMSEN *et al.*, 2012; GOLDBERG *et al.*, 2013; JERDE *et al.*, 2013; PIAGGIO *et al.*, 2014). Segundo Eichmiller (2016), em seu trabalho relata as diferentes afinidades de ligação para diferentes papéis filtros utilizados para capturar o eDNA. Em outro trabalho, o tamanho dos poros influenciou diretamente a taxa de captura do DNA de peixes, além de relatar diversos tipos de filtros usados (SHU *et al.*, 2020). Dessa maneira podemos perceber que a utilização de membranas mais eficazes para a coleta do material, terão um melhor desempenho na hora de realizar as análises, e obter resultados mais relevantes.

Mesmo ocorrendo diversas pesquisas atualmente na área, ainda há locais que não se tem registros de estudos e protocolos eficazes, como por exemplo, em áreas de cachoeiras, onde se tem um acesso muitas vezes limitados devido à sua localização. No estado do Piauí, no município de Pedro II, apresenta uma vasta área de cachoeiras ainda pouco exploradas por seu difícil acesso, algumas são pontos turísticos visitados constantemente. Por ter uma localização difícil de se acessar, juntamente, com o pouco conhecimento das trilhas que levam

até as cachoeiras, poucos estudos são realizados na área. Com isso o presente estudo teve como objetivos: (i) utilizar três tipos de membranas para capturar do DNA ambiental, testando sua eficácia na região da cachoeira do Lajedo; (ii) propor um novo método de coleta em áreas de difícil acesso de uma maneira que evite a degradação das amostras até chegarem em laboratório para análise; (iii) criar um equipamento portátil para coletar as amostras em uma área mais ampla, melhorando o potencial de captura e otimizando o tempo de coleta; (iv) comprovar a eficácia do método de coleta.

2 MATERIAL E METÓDOS

2.1 LOCAL DE COLETA

O estudo ocorreu na cidade de Pedro II, estado do Piauí, Brasil, localizada a 204 km da capital Teresina. Tendo como ponto de coleta uma cachoeira localizada nas proximidades da cachoeira do Urubu-Rei uma das maiores cachoeiras do Piauí com aproximadamente 76 metros de queda d'água, ocorrendo água o ano todo e diversos pontos de acúmulo de pequenas possas de água ao seu redor, muitas aonde, residem alguns peixes. O referido tem seu acesso por uma trilha, que tem seu percurso feito em média de 40 minutos que se localiza próximo ao Morro do Gritador, sendo também uma cachoeira em menor escala, conhecida como cachoeira do Lajedo (FIGURA I). A cachoeira do Lajedo apresenta em sua composição espécies de peixes, plantas e fungos que se encontram em local isolado, além de apresentar uma vegetação de árvores altas e fechadas nos seus arredores.

FIGURA I: Cachoeira do Lajedo.



Fonte: Próprio autor.

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta decorreu-se com a captura das amostras de água após a queda d'água da cachoeira do Lajedo, sendo realizada a partir do mês de janeiro período chuvoso da região, onde o acúmulo de água na cachoeira e nas poças vai apresentar um maior volume. Com o intuito de melhorar o resultado no momento da coleta, as amostras foram coletadas de diferentes profundidades, devido ao fluxo da água corrente e da queda d'água na cachoeira o DNA pode estar concentrado tanto no fundo, como na região superficial ou ao longo do caminho percorrido pela água formando as poças ao redor do percurso da cachoeira. Portanto coletamos em diferentes profundidades, na superfície da água, em uma profundidade mediana e no ponto mais fundo do local, ocorrendo um melhor aproveitamento da área amostral durante a coleta.

Para a captura das amostras do eDNA da água contamos com o auxílio de um equipamento portátil (FIGURA II), montado com o propósito de coletar e reter as partículas de eDNA de uma maneira mais rápida otimizando o tempo e a quantidade de amostras coletadas que podem estar presentes na água do local, aperfeiçoando os métodos antigos de coleta.

FIGURA II: Equipamento portátil para coleta de amostras aquáticas.

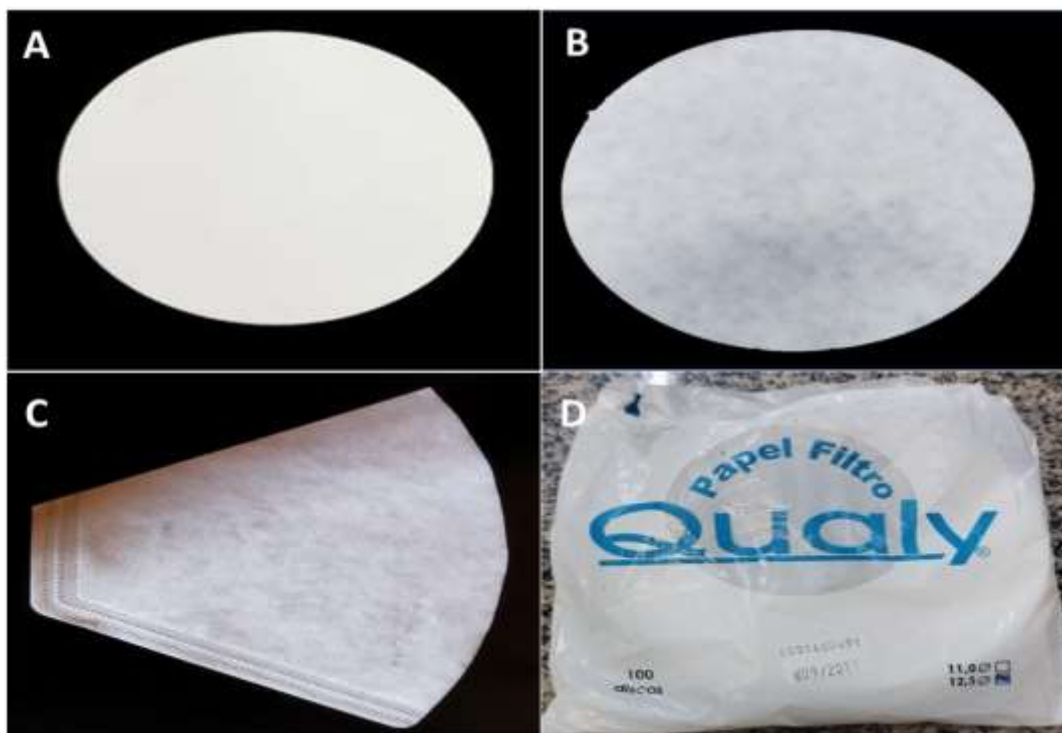


Fonte: Próprio autor.

O equipamento é composto por uma bomba de sucção de 12w, que gera uma força de sucção para puxar a água para dentro do equipamento. Em um primeiro momento coletamos a água com o auxílio do equipamento, a sucção da água ocorre por uma mangueira acoplada ao equipamento, passando inicialmente por um pente com 16 dentes de 10 a 20 mm, na qual impedirá a passagem de resíduos e sujeiras maiores, proporcionando que a água passe sem maiores dificuldades e impedindo o entupimento do equipamento. Após a passagem pela tela de proteção, no meio do equipamento terá um filtro pequeno, com a finalidade de reter os resíduos que passaram pelo coletor em forma de pente, ocorrendo assim, apenas a passagem da água com as partículas de interesse. Após a passagem pelo filtro a água sairá na parte traseira do equipamento onde estarão posicionadas quatro saídas (diâmetro = 4 cm) na extensão de outra mangueira pequena. As saídas contêm em seu interior filtros contendo as membranas de retenção escolhidas para testar sua eficácia na região de cachoeira, ocasionando apenas a passagem da água. As membranas de retenção que foram usadas são: (i)

membrana de nylon (25 μ m), (ii) membrana de polipropileno (filtro de café) (20 μ m) e (iii) papel filtro (14 μ m) (FIGURA III), cortadas de maneira circular com diâmetro de 4 cm, a captura foi realizada com equipamento na água, realizando movimentos circulares e andando com o equipamento por toda a área da cachoeira, para que tivesse um melhor aproveitamento amostral.

FIGURA III: Membranas utilizadas na coleta.



Fonte: Próprio autor. Membranas utilizadas na coleta: (A) Membrana de nylon, (B) Membrana de papel filtro, (C) Filtro de café e (D) Papel filtro.

No total 24 amostras foram coletadas, sendo estas, oito utilizando cada membrana citada acima (Tabela 1), e abordando as três profundidades mencionadas, com um tempo de coleta para cada amostra estimado em cinco minutos, repetindo essa etapa duas vezes para cada filtro.

Tabela 1: Tipo, quantidade e porosidade das membranas usadas.

MEMBRANA	NÚMERO DE AMOSTRAS	POROSIDADE
Nylon	8	25 μ m
Polipropileno	8	20 μ m
Papel filtro	8	14 μ m

Fonte: Próprio autor.

Encerrado os 5 minutos o equipamento era retirado da água, para a troca das membranas, retiradas com o uso de luvas e o auxílio de uma pinça, lavada com álcool a cada troca para evitar contaminação, em seguida foram colocadas em microtúbulos de 5 ml (24

microtúbulos no total). Sendo oito microtúbulos para cada tipo de membrana, dentro de cada microtúbulo foi adicionado 2 ml de solução de lise (1 % SDS; 30 mM tris-pH 8; 10 mM de EDTA; 0,75 M de NaCl), em cada recipiente, seguindo os protocolos trazidos em Kumar e colaboradores (2020), preservando-os até o momento da purificação, extração e análise em laboratório. Finalizando a etapa de coleta, as amostras foram condicionadas e levadas para extração de DNA em laboratório.

A escolha das membranas se deu pelo seu baixo custo e facilidade de acesso, testando assim um meio mais econômico de coletar o DNA ambiental, estudando a capacidade de retenção de células das membranas em ambientes aquáticos.

2.3 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

As extrações foram feitas no Laboratório de Biologia Molecular e Epidemiologia (LABME) – localizado no Térreo do Prédio C, sala C03 do INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA, Campus Teresina Central - PIAUÍ. Em laboratório os microtúbulos passaram pela etapa de extração, seguindo o protocolo de extração de DNA descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

Foram aliquotados 2 mL do tampão de lise (1 % SDS; 30 mM tris-pH 8; 10 mM de EDTA; 0,75 M de NaCl) em microtúbulos de polipropileno de 5 mL, junto com a membrana de coleta. Em seguida foi agitado e homogeneizado em vórtex em velocidade máxima, por 1 minuto. Adicionou-se mais 500 µL do tampão de lise ao microtúbulo, onde o material foi homogeneizado em vórtex novamente por alguns segundos e foram adicionados 30 µL de proteinase K (20 mg/ml), incubando na estufa a 65 °C por 2 horas para a digestão completa das proteínas. Durante a incubação, os microtúbulos foram invertidos de 8-10 vezes a cada 10 minutos. Completado o período na estufa, os microtúbulos foram retirados e o conteúdo do tampão de lise foram distribuídos igualmente em 2 microtúbulos menores de 2 mL. Um dos microtúbulos conterá a membrana coletora do tubo de extração.

Em cada microtúbulo, 700 µL de Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1). Depois, inverteu-se cada tubo de 6 a 10 vezes e, em seguida, segurou no vórtex por 2 minutos e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos; e depois, retirou a fase aquosa para um outro tubo limpo, onde foi adicionado 700 µL de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) (SAMBROOK *et al.* 1989). Inverteu os tubos de 6 a 10 vezes e em seguida, colocou no vórtex por 2 minutos; depois, deixando na centrifuga a 12.000 rpm por 10 minutos, para depois retirar a fase aquosa em outro tubo limpo. Adicionou-se 500 µL de álcool etílico: isopropanol (v/v) e, pipetou-se levemente. Transferiu-se todo o volume da amostra líquida para um outro tubo com coluna de purificação e, centrifugou-se a 12.000 rpm por 40 segundos à temperatura ambiente.

O resíduo do tubo coletor foi descartado. Recolocou-se novamente a coluna de purificação no mesmo tubo e, centrifugado a 12.000 rpm durante 1 minuto, para remover resíduos de álcool. Transferiu-se a coluna de purificação para um outro tubo limpo de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL de TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) pH 8, no centro da membrana do filtro branco. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente. Ocorreu o descarte da coluna de purificação, o tubo de coleta de 1,5 mL contendo o DNA está concluído. O DNA extraído foi estocado em freezer.

2.4 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA

Para a análise da integridade do DNA genômico extraído, foram feitas corridas eletroforéticas em géis de agarose a 0,8% e tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3) contendo SYBR Safe. Retirou-se 5 µL de DNA

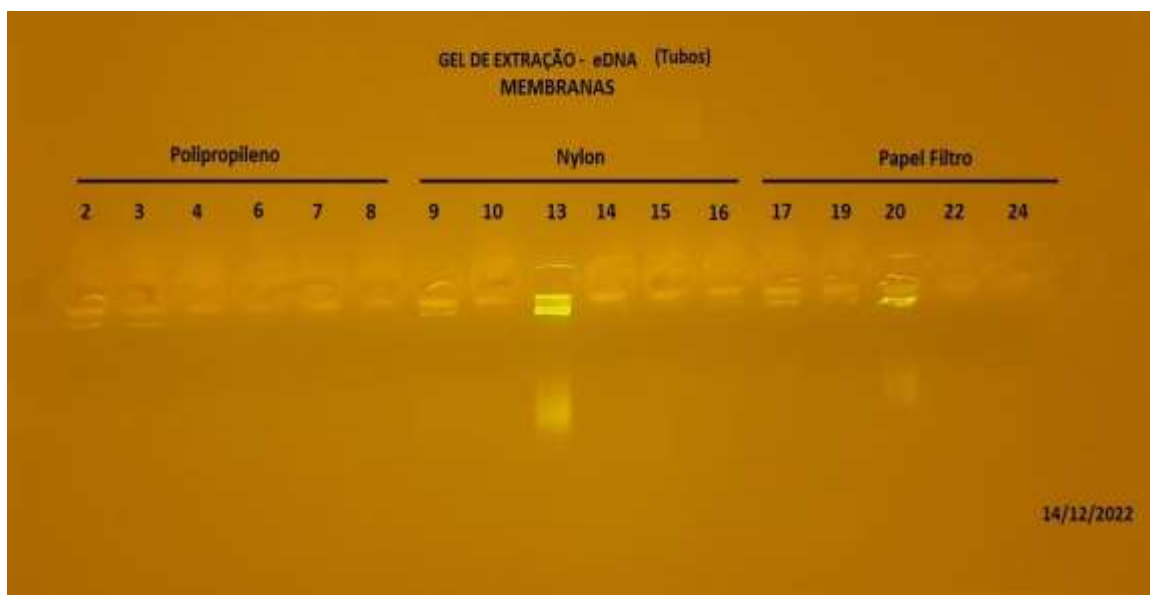
genômico, diluídos em 8 µL de tampão de corrida (TrisHCl 0,1 M, pH 6,8; SYBR Green), que foi pipetado para homogeneizar e inserir nos poços do gel de agarose. A cuba de eletroforese ficou ligada por 40 minutos em tensão de 120V. Ao final da corrida, o DNA foi visualizado no gel e fotografado sobre um transiluminador com led azul de 470nm, por um aparelho celular Samsung A50.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando membranas de nylon, polipropileno e papel filtro, o dispositivo de coleta demonstrou ser capaz de reter uma série de amostras celulares de organismos aquáticos presentes na cachoeira do Lajedo, como mostra a visualização do DNA ambiental em Gel de Agarose (FIGURA IV), a membrana de Nylon já teve sua eficácia de retenção comprovada em outros estudos (SHU *et al.*, 2020; GOLDBERG *et al.*, 2016; TURNER *et al.* 2014). Já as membranas feitas com polipropileno (filtro de café) e papel filtro, foram capazes de reter também as amostras coletadas, sendo uma surpresa, devido ao fato de não ter estudos comprovando sua eficácia.

Até o momento da realização do estudo não se teve relatos em outros trabalhos, assim como, na bibliografia lida não apresentava essa possibilidade, voltando-se apenas para os resultados em PCR(REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) para identificação de espécies específicas, como no estudos de Eva e colaboradores (2016) que traz em seu conteúdo a identificação do *Pangasionodon gigas* (peixe-gato-gigante), em perigo crítico de extinção, espécie proveniente do Rio Mekong, no sudeste da Ásia, e em Balasingham e colaboradores (2018) que traz a detecção de três espécies raras de peixes (*Ammocrypta pellucida*, *Noturus stigmosus* e *Notropis photogenis*), provenientes do Canadá.

Figura IV: Visualização do material coletado das membranas em Gel de Agarose.



Fonte: Próprio autor.

O grau de eficácia das membranas mostrou-se diverso, devido as diferenças de porosidades, fator este, que afeta diretamente seu nível de retenção de partículas (HINLO *et al.*, 2017). Outro fator que pode ter influenciado na retenção, foi o método utilizado no estudo, que se diferiu da maneira tradicional de coleta de DNA, trazendo uma forma mais prática e rápida de captura de eDNA. Além disso a escolha de membranas certas pode alterar a taxa fluxo para estudos de eDNA, pois pode diminuir o tempo de filtração significativamente,

contribuindo para o fator de degradação (HINLO *et al.*, 2017). Estas considerações são importante na hora de realizar pesquisas com eDNA. Assim a abordagem da coleta direta realizada com o auxílio do equipamento portátil tem uma grande relevância para os próximos estudos, tal qual, a retenção do material pelas membranas utilizadas, com a compatibilidade com o protocolo de extração. Estudos relatam que a combinação do tipo de membrana, e a maneira como a coleta é realizada, infere diretamente nos resultados finais (LIANG e KEELEY, 2013), levando em conta também o local onde cada estudo é realizado, seus métodos de coletas também se diferenciam e são aperfeiçoados para obter o melhor resultado possível, como em diversos estudos que trazem alguns protocolos de amostragem elaborados e realizados em regiões distintas, como por exemplo, os trazidos em Kumar e colaboradores (2020), Evans *et al.* (2018) e Lear *et al.* (2018).

4 IMPLICAÇÕES FUTURAS

Apesar da ocorrência de diversos estudos em ambientes aquáticos, ainda há uma lacuna em locais que apresentam queda d'água, assim como um método eficaz de captura de DNA. Contudo o método testado se mostrou eficaz para a captura e retenção do eDNA pelas membranas, em regiões como a cachoeira que se sucedeu o estudo, obtendo a aplicabilidade do protocolo aplicado. Com a comprovação do DNA visualizado em gel de extração (Gel de agarose), abre-se novas possibilidades para aprimorar ainda mais o dispositivo de coleta, utilizando inclusive outras combinações de membranas. Assim o estudo se mostrou bastante relevante na área de pesquisas com eDNA, utilizando materiais acessíveis e um equipamento portátil desenvolvido para melhorar a captura das células. Visto que uma das dificuldades de realizar pesquisas com o DNA ambiental se dá pelo acesso ao material para coleta e análise, uma vez que, vários protocolos para métodos de eDNA, impede que iniciantes realizem os estudos com eficiência, e os resultados publicados são difíceis diz respeito à sua confiabilidade.

REFERÊNCIAS

- BALASINGHAM, K. D.; WALTER, R. P.; MANDRAK, N. E.; HEATH, D. D. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two great lakes tributaries. **Molecular ecology**, v. 27, p. 112-127, 2018.
- BARNES, M. A.; TURNER, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation generics. **Conservation Genetics**, v. 17, n. 1, p. 1 – 17, 8 de fev. 2016.
- CARIM, K. J. et al. A protocol for collecting environmental DNA samples from streams. **USDA Forests Service – General Technical Repost RMRS-GTR**, v. 19, n. 3, p. 1 – 18, 2016.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11–15, 1987.
- EICHMILLER, J. J.; MILLER, L. M.; SORENSEN, P. W. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. **Molecular ecology resources**. v. 16, p. 56 – 68, 2016.

- EVA, B. *et al.* Trails of river monsters: Detecting critically endangered Mekong Giant catfish *Pangasianodon gigas* using environmental DNA. **Global Ecology and Conservation**, v. 7, p. 148 – 156, 2016.
- FICETOLA, G. F. *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**, v. 4, n. 4, p. 423 – 425, 2008.
- GOLDBERG, C. S.; SEPULVEDA, A.; RAY, A.; *et al.* (2013) Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*) Freshwater. **Science**, v. 32, p. 792–800, 2013.
- GOLDBERG, C. S.; TURNER, C. R.; DEINER, K.; *et al.* Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. **Methods Ecol. Evol.**, v. 7, p. 1299–1307, 2016.
- HINLO, R.; GLEESON, D.; LINTERMANS, M.; FURLAN, E. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 2017.
- JERDE, C. L.; CHADDERTON, W. L.; MAHON, A. R.; *et al.* Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 70, p. 522–526, 2013.
- KELLY, R. P.; PORT, J. A.; YAMAHARA, K. M.; *et al.* Harnessing DNA to improve environmental management. **Science**, v. 344, p. 1455 – 1456, 2014.
- KUMAR, G.; EBLE, J. E.; GAITHER, M. R. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 1, p. 29–39, 2020.
- LEAR, G. *et al.* Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 42, 2018.
- LIANG, Z.; KEELEY, A. Filtration Recovery of Extracellular DNA from Environmental Water Samples. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 16, p. 9324–9331, 2013.
- MINAMOTO, T.; YAMANAKA, H.; TAKAHARA, T.; HONJO, M. N.; KAWABATA, Z. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. **Limnology**, v. 13, p. 193–197, 2012.
- PIAGGIO, A.J.; ENGEMAN, R. M.; HOPKEN, M. W.; *et al.* Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, p. 374–380, 2014.
- PILLIOD, D.S.; GOLDBERG, C.S.; ARKLE, R.S.; WAITS, L.P. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 70, p. 1123–1130, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.E.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Lab. Press, New York**, 1989.

TABERLET, P. *et al.* Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1816 – 1820, 2012.

THOMSEN, P. F.; WILLERSLEV, E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological Conservation**, v. 183, p. 4 – 18, 2015.

THOMSEN, P.F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L.L.; MOLLER, P.R.; RASMUSSEN, M.; WILLERSLEV, E. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. **PLoS ONE**, v. 7, e41732, 2012.

TURNER, C. R.; BARNES, M. A.; XU, C. C. Y.; JONES, S. E.; JERDE, C. L.; LODGE, D. M.; GILBERT, M. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. **Methods Ecol. Evol.** v. 5, p. 676–684, 2014.

WILLERSLEV, E. *et al.* Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. **Science**, v. 300, n. 5620, p. 791–795, 2003.

WILSON, C.; WRIGHT, E.; BRONNENHUBER, J.; MACDONALD, F.; BELORE, M.; LOCKE, B. Tracking ghosts: combined electrofishing and environmental DNA surveillance efforts for Asian carps in Ontario waters of Lake Erie. **Management of Biological Invasions**, v. 5, p. 225-231, 2014.