

MARÇO/2023

 LabTrans[®]

MANUAL DE ANÁLISE DOS LABORATÓRIOS



MINISTÉRIO DE
**PORTOS E
AEROPORTOS**

Secretaria Nacional de Aviação Civil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC)
LABORATÓRIO DE TRANSPORTES E LOGÍSTICA (LABTRANS)
SECRETARIA NACIONAL DE AVIAÇÃO CIVIL (SAC)

MANUAL DE ANÁLISE DOS LABORATÓRIOS

MARÇO/2023

SUMÁRIO

1	Introdução.....	3
2	Metodologia dos 7 Passos.....	4
2.1	Recebimento e processamento da amostra.....	4
2.2	Extração de DNA.....	10
2.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	10
2.4	Eletroforese.....	11
2.5	Preparação das amostras	12
2.6	Transporte	12
2.7	Identificação das amostras.....	14
2.7.1	<i>BOLD Systems</i>	14
2.7.2	National Center for Biotechnology Information (NCBI).....	17
2.8	Preenchimento do formulário UFSC do resultado.....	19
	Referências.....	21
	Lista de figuras.....	22
	Lista de tabelas	23
	Lista de siglas.....	23

1 INTRODUÇÃO

A colisão entre aves e aeronaves ocorre com frequência no mundo, colocando em risco a vida de tripulantes e de passageiros, além de gerar impacto econômico para as companhias aéreas. Portanto, a identificação correta da avifauna que colide com essas aeronaves se torna importante, pois é necessário reconhecer o perigo e, posteriormente, elaborar e executar estratégias de mitigação aos riscos gerados pelas colisões (CENIPA, 2021).

Para que o gerenciamento de fauna ocorra da melhor maneira possível, é necessário realizar a identificação da fauna, principalmente dentro dos aeródromos, para que medidas preventivas possam ser tomadas (CENIPA, 2021). Quando possível, a identificação do animal que colidiu com a aeronave é efetuada por identificação morfológica, utilizando partes do animal, por exemplo, penas e plumas. Entretanto, quando a amostra biológica disponível não permite a identificação do animal morfológicamente, como sangue ou outros fluidos, vísceras e/ou restos de tecidos, a identificação por DNA¹ é necessária (CARVALHO; FASSIO; PARANAÍBA, 2020). Devido à facilidade e à rapidez na identificação de espécies, a utilização de DNA *barcodes* vem se mostrando de grande importância, permitindo a identificação rápida de organismos por outros pesquisadores além de taxonomistas (LI *et al.*, 2017; W *et al.*, 2014; MARQUES, 2015).

A técnica de DNA *barcoding*, proposta por Hebert *et al.* (2003), tem como finalidade utilizar uma região padronizada para a identificação de espécies. Para grande parte dos metazoários, utiliza-se um fragmento do gene mitocondrial *Citocromo C Oxidase I* (COI), que possui, em média, 650 pares de base (pb). Essa região apresenta pouca variação entre indivíduos da mesma espécie e grande variação entre espécies diferentes, sendo um bom marcador para a identificação de espécies (HEBERT *et al.*, 2003).

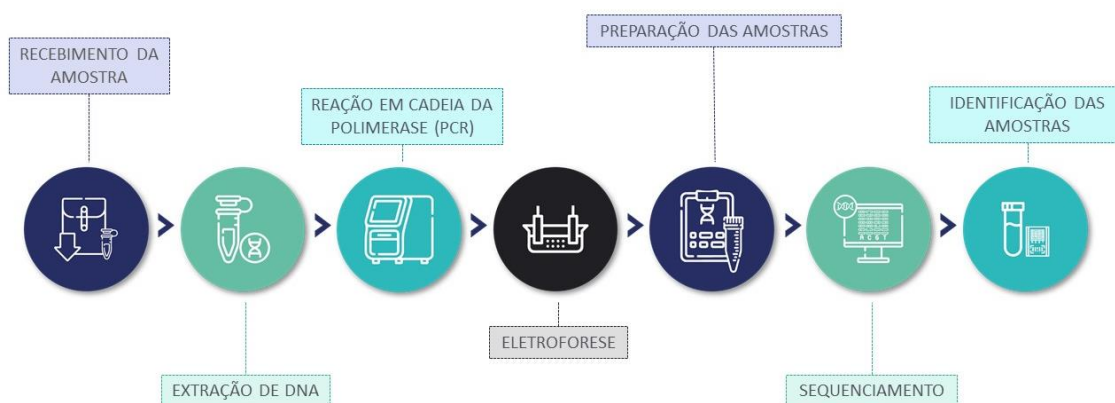
Na sequência, é apresentado o detalhamento desse processo de desenvolvimento referente à análise laboratorial, através da Metodologia dos 7 Passos.

¹ Ácido Desoxirribonucleico.

2 METODOLOGIA DOS 7 PASSOS

Para o desenvolvimento da metodologia laboratorial, foi elaborado um processo dividido em sete passos, descrevendo cada etapa principal realizada dentro de cada laboratório, como exposto na Figura 1.

Figura 1 – Esquema ilustrativo da Metodologia dos 7 Passos



Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

A seguir, é demonstrado o detalhamento de cada etapa da Metodologia dos 7 passos, estruturada em:

- Recebimento e processamento da amostra.
- Extração de DNA.
- Reação em cadeia da polimerase (PCR).
- Eletroforese.
- Preparação das amostras.
- Sequenciamento.
- Identificação das amostras.

2.1 RECEBIMENTO E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

O laboratório parceiro receberá as amostras em lotes, que poderão conter diferentes número de amostras por vez. O número de amostras por lote dependerá da quantidade de coleta que o aeródromo realizou no mês.

Ao receber o lote, o laboratório deverá reportar o recebimento no Formulário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) condizente ao recebimento do lote, como apresentado na Figura 2, preenchendo:

1. Lote (ICAO + AAMM): o código do lote será a junção do código ICAO (do inglês – International Civil Aviation Organization), que identifica o aeródromo de origem através de quatro letras, mais os dois últimos números do ano e os dois números do mês de coleta (estará disponível na etiqueta do malote). Observação: apenas letras maiúsculas e sem espaçamento entre os caracteres.
2. Responsável pelo preenchimento: colocar o responsável pelo preenchimento do formulário.

Figura 2 – Formulário UFSC para preenchimento do recebimento do lote

SAC - FAUNA

LabTrans

MINISTÉRIO DE PORTOS E AEROPORTOS

Registro de recebimento do lote

Registrar no momento que a amostra for entregue no Laboratório.

*Obrigatório

Lote *
(ICAO + AAMM)

Sua resposta

Responsável pelo preenchimento *

Sua resposta

Enviar

Limpar formulário

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Após o recebimento do malote, abrir e conferir todas as amostras na planilha de acompanhamento da UFSC (*Dashboard* de acompanhamento), como indicado na Figura 3. Para verificar as amostras na planilha de acompanhamento, é necessário:

1. Abrir a aba “Amostras ativas”.
2. Procurar pelo número do malote na coluna “Lote”.
3. Contar quantas amostras têm o mesmo número de lote na planilha. **NOTA 1:** as amostras que foram enviadas pelo aeródromo e que tiveram seu malote recebido pelo laboratório constarão como “3. Em análise” na coluna “Status” da planilha de acompanhamento e a sigla do respectivo laboratório de análise na coluna “Laboratório”.

Figura 3 – *Dashboard* de acompanhamento

FAUNA - DASHBOARD						
Amostras Ativas						Registros: 41
CÓDIGO	DATA REGISTRO	STATUS	ORIGEM	LOTE	CÓDIGO DE RASTREAMENTO	LABORATÓRIO
BQKAC20232	15/03/23 qua. 11h32	3. Em análise	Fortaleza	SBFZ2303	OV038360065BR	UFAL
MRSC202301	15/03/23 qua. 07h51	3. Em análise	Florianópolis	SBFL2303	XXYY01	UFSC
BQKAC2023	09/03/23 qui. 16h04	3. Em análise	Fortaleza	SBFZ2302	OV038360065BR	UFAL
BR2023A6	06/03/23 seg. 15h50	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A5	06/03/23 seg. 15h50	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A43	06/03/23 seg. 15h48	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A42	06/03/23 seg. 15h48	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A41	06/03/23 seg. 15h48	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A33	06/03/23 seg. 15h47	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A32	06/03/23 seg. 15h47	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A31	06/03/23 seg. 15h46	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A2	06/03/23 seg. 15h45	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A1	06/03/23 seg. 15h45	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
00220238	01/03/23 qua. 10h52	3. Em análise	Porto Alegre	SBPA2302	QB932414462BR	UFSC
00220237	01/03/23 qua. 10h51	3. Em análise	Porto Alegre	SBPA2302	QB932414462BR	UFSC
00220236	01/03/23 qua. 10h51	3. Em análise	Porto Alegre	SBPA2302	QB932414462BR	UFSC

Links ▾ **Amostras Ativas ▾** Resultados ▾ Histórico Completo ▾ Log de registros ▾ Indicadores ▾

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Caso o número de amostras presentes na planilha não corresponda ao número de amostras recebidas no malote, é necessário identificar quais foram recebidas. Para isso, compare o código presente na coluna "**Código**" da planilha de acompanhamento (conforme demonstrado na Figura 4) com o código presente no campo "**código da amostra**" do envelope da amostra (conforme ilustrado na Figura 5).

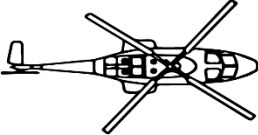




Figura 4 – Dashboard de acompanhamento ressaltando o código da amostra

FAUNA - DASHBOARD						
Amostras Ativas						
Registros: 41						
CÓDIGO	DATA REGISTRO	STATUS	ORIGEM	LOTE	CÓDIGO DE RASTREAMENTO	LABORATÓRIO
BQKAC20232	15/03/23 qua. 11h32	3. Em análise	Fortaleza	SBFZ2303	OV038360065BR	UFAL
MRSC202301	15/03/23 qua. 07h51	3. Em análise	Florianópolis	SBFL2303	XXYY01	UFSC
BQKAC2023	09/03/23 qui. 16h04	3. Em análise	Fortaleza	SBFZ2302	OV038360065BR	UFAL
BR2023A6	06/03/23 seg. 15h50	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A5	06/03/23 seg. 15h50	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A43	06/03/23 seg. 15h48	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A42	06/03/23 seg. 15h48	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A41	06/03/23 seg. 15h48	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A33	06/03/23 seg. 15h47	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A32	06/03/23 seg. 15h47	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A31	06/03/23 seg. 15h46	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A2	06/03/23 seg. 15h45	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
BR2023A1	06/03/23 seg. 15h45	3. Em análise	Brasília	SBBR2302	QB837428077BR	UFG
00220238	01/03/23 qua. 10h52	3. Em análise	Porto Alegre	SBPA2302	QB932414462BR	UFSC
00220237	01/03/23 qua. 10h51	3. Em análise	Porto Alegre	SBPA2302	QB932414462BR	UFSC
00220236	01/03/23 qua. 10h51	3. Em análise	Porto Alegre	SBPA2302	QB932414462BR	UFSC

Links ▾ Amostras Ativas ▾ Resultados ▾ Histórico Completo ▾ Log de registros ▾ Indicadores ▾

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Figura 5 – Envelope da amostra

INFORMAÇÕES DA AMOSTRA	
ÁREA DE COLISÃO: <input type="checkbox"/> Radome <input type="checkbox"/> Motor (esq.) <input type="checkbox"/> Asa/rotor (esq.) <input type="checkbox"/> Trem de pouso (esq.) <input type="checkbox"/> Outras: <input type="checkbox"/> Para-brisas <input type="checkbox"/> Motor (dir.) <input type="checkbox"/> Asa/rotor (dir.) <input type="checkbox"/> Trem de pouso (dir.) _____ <input type="checkbox"/> Nariz (exceto anteriores) <input type="checkbox"/> Hélice(s) (nº _____) <input type="checkbox"/> Fuselagem <input type="checkbox"/> Cauda _____	
LOCAL DA COLISÃO (marque com um x): <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>	
TIPO DE AMOSTRA: <input type="checkbox"/> Tipo 1 (sangue, fragmentos ou fluidos) <input type="checkbox"/> Tipo 2 (penas)	
CÓDIGO DA AMOSTRA (portal oficial de notificação):	OBSERVAÇÕES:
AERÓDROMO (ICAO):	
DATA DA COLETA:	
ENVELOPE EXCLUSIVO PARA AMOSTRA	
<small>APOIO TÉCNICO À SAC NA ELABORAÇÃO DE ESTUDOS AFETOS AO GERENCIAMENTO DE RISCO DE FAUNA EM AERÓDROMOS BRASILEIROS</small>	
	

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Caso o laboratório não receba o lote ou alguma amostra, deverá reportar o extravio no Formulário UFSC de amostra extraviada, ilustrado na Figura 6, preenchendo as seguintes informações:

1. Responsável pelo preenchimento: colocar o responsável pelo preenchimento do formulário.
2. Tipo ocorrência:
 - Selecionar a opção “1. Amostra ausente no pacote/lote” se a amostra foi extraviada.
 - Selecionar a opção “2. Lote extraviado no transporte ou não recebido” se o lote foi extraviado/não foi recebido.
3. Lote (ICAO + AAMM): o código do lote será a junção do código ICAO (que identifica o aeródromo de origem através de quatro letras) mais os dois últimos números do ano e os dois números do mês de coleta (estará disponível na etiqueta do malote). Observação: apenas letras maiúsculas e sem espaçamento entre os caracteres.
4. Código SIGRA (Sistema de Gerenciamento de Risco Aviário): colocar o código obtido através do registro do reporte da colisão no portal oficial de notificação. Observação: apenas letras maiúsculas e sem espaçamento entre os caracteres.
5. Observações: caso tenha alguma observação pertinente referente à amostra extraviada, discorrer neste campo.

Figura 6 – Formulário UFSC de amostra extraviada

SAC - FAUNA

LabTrans

MINISTÉRIO DE PORTOS E AEROPORTOS

Amostra extraviada

*Obrigatório

Responsável pelo preenchimento *

Sua resposta

Tipo ocorrência *

1. Amostra ausente no pacote/Lote

2. Lote extraviado no transporte ou não recebido

Lote *

(ICAO + AAMM)

Sua resposta

Código SIGRA

Sua resposta

Observações

Sua resposta

Enviar [Limpar formulário](#)

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

As amostras virão individualmente em embalagens desenvolvidas pensando no material biológico. A identificação da amostra dentro do laboratório deve ser efetuada a partir do código da amostra e as demais informações são de uso do aeródromo.

As amostras de pena virão acondicionados em envelopes; já as amostras de sangue ou de fluidos virão acondicionadas em *Swab* estéreis ou álcool *Swab* dentro de tubos tipo *Falcon*. As amostras de tecido ou de outros fragmentos do animal (pedaços de órgãos ou pele) virão acondicionadas em tubos tipo *Falcon* estéreis.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Devido à possível variabilidade de amostras para obtenção do DNA, a extração do DNA genômico será realizada a partir de um *kit* com o potencial para extrair tanto sangue quanto amostras de tecidos e de outros fragmentos, abrangendo, assim, as possíveis amostras biológicas decorrentes de colisões.

Em caso de amostras de pena, o material genético deve ser retirado do cálcamo das penas, região que entra em contato com o corpo do animal e, portanto, possui células. Caso a amostra seja proveniente de tecidos, deve-se transferir um fragmento do tecido desejado de, aproximadamente, 3 cm³ para um microtubo estéril. Em caso de amostras de sangue ou de fluidos, o DNA deve ser extraído a partir do *Swab* ou álcool *Swab*, contendo o material biológico. Para melhor aproveitamento da amostra, a ponta do *Swab* (parte com material biológico) e a maior parte com material biológico do álcool *Swab* devem ser cortadas e acondicionadas dentro do microtubo onde será executada a extração. O processo de extração deverá seguir com o *Swab* dentro do tubo até na primeira etapa de lise celular.

2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O marcador molecular utilizado para identificação das espécies será um fragmento do gene *Citocromo C Oxidase subunidade I* (COI) do DNA mitocondrial. Para amplificação da região de interesse, o *primer BirdF1/Bird R1* (HEBERT *et al.*, 2004) será utilizado.

O par de *primer BirdF1/BirdR1* é sugerido para amplificação de avifauna no livro *DNA Barcodes: Methods and Protocols*, no capítulo *DNA Barcoding Birds: From Field Collection to Data Analysis* (LOPEZ; ERICKSON, 2016). Como o projeto visa à amplificação de um fragmento do gene COI de avifauna, a utilização do par de *primer* universal para aves *BirdF1/BirdR1* foi escolhido.

Para a reação de amplificação, será utilizada a polimerase *GoTaq G2 Hot Start Polymerase*. A Tabela 1 evidencia os reagentes necessários para reação. Os reagentes *Buffer Green* e *MgCl2* vêm no kit com a *GoTaq G2 Hot Start Polymerase*.

Tabela 1 – Reagentes e suas respectivas quantidades para amplificação do marcador molecular na reação de PCR de uma amostra

REAGENTE	QUANTIDADE (UL)
H2O Mili-Q	20,0
<i>Buffer</i> (5x)	8,0
MgCl2 (25 mM)	4,0
dNTP (10 mM)	0,8
<i>Primer F</i> (10 mM)	1,0
<i>Primer R</i> (10 mM)	1,0
<i>GoTaq</i> (5u/uL)	0,2
DNA	5,0
TOTAL	40,0

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Os microtubos com a solução para amplificação deverão ir para o termociclador sob as condições descritas no protocolo de temperatura da Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolo de temperatura para amplificação do marcador molecular

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLO
Desnaturação inicial	95°C	9 minutos	1X
Desnaturação	95°C	30 segundos	40 X
Anelamento	48°C	45 segundos	
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1X

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Modificações no protocolo de temperatura podem se fazer necessárias dependendo das amostras utilizadas.

2.4 ELETROFORESE

Para a verificação da qualidade da amplificação do fragmento de interesse, o produto de PCR deverá ser analisado em gel de agarose 1%, utilizando o intercalante de DNA *UniSafe*. A confecção e a corrida do gel serão através do *Tris-Borate-EDTA* (TBE). A Tabela 3 apresenta um modelo para preparo do gel de agarose.

Para corrida do gel, serão utilizados 5 uL do produto de PCR e 2 uL do Peso Molecular para verificar se o fragmento amplificado possui o tamanho desejado. A corrida será de 40 minutos, a 120 V em uma corrente de 300 mA.

Tabela 3 – Reagentes e quantidades necessárias para confecção de gel de agarose 1% (exemplo para um gel de 40 ml)

REAGENTE	QUANTIDADE
TBA	40,0 ml
Agarose	0,4 g
UniSafe	1,5 uL

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

As amostras que tiverem seu DNA amplificado seguirão para os passos seguintes. Já para as amostras que não tiverem seu DNA amplificado, recomenda-se repetir o experimento e, caso o erro persista, a amostra deve ser descartada e o laboratório deverá preencher o Formulário UFSC de registro do resultado da análise, assinalando a opção “Amostra inválida/sem utilidade para análise” na seção “*Databases for Sequences & Barcoding*”.

2.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após a verificação da amplificação do fragmento, a purificação desse material deverá ser realizada para que este possa ser enviado para sequenciamento. Após a purificação, preparar as amostras com o DNA purificado mais o *primer*. Para cada amostra, deverá ser enviado apenas uma amostra com o *primer Forward*.

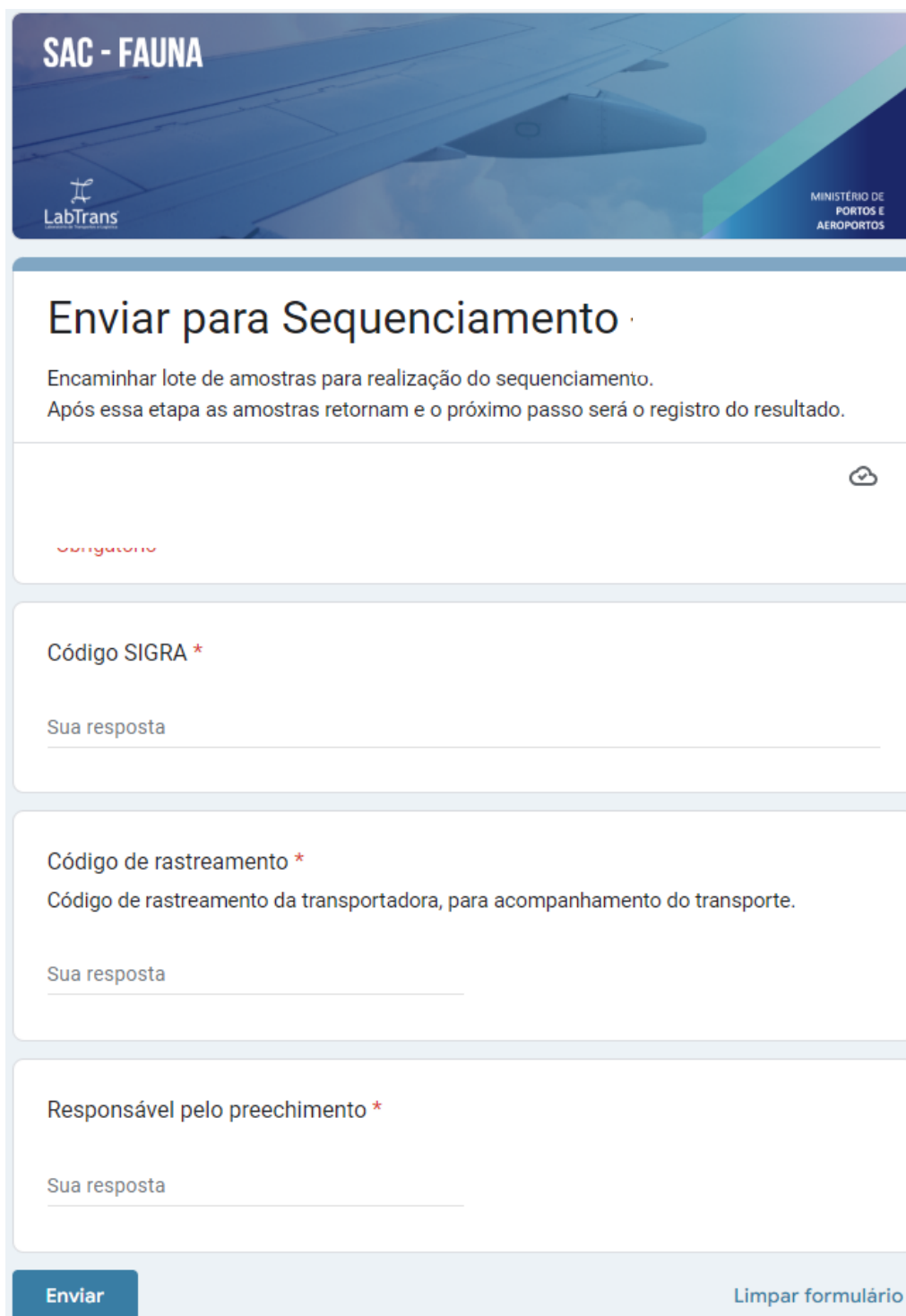
2.6 TRANSPORTE

Após a preparação das amostras, o laboratório deverá enviá-las para sequenciamento. Para tanto, o laboratório receberá por *e-mail* pelo Laboratório de Transportes e Logística (LabTrans/UFSC) o vale Correios, sempre na primeira semana de cada mês. Caso não haja material para enviar, deve-se desconsiderar o vale. Caso haja, levar o material para os Correios e fazer o envio deste. Com o envio, será obtido o código de rastreamento, que será necessário na próxima atividade.

Tendo o código de rastreamento, o laboratório deverá preencher o Formulário UFSC do envio para sequenciamento, indicado na Figura 7, com as seguintes informações:

1. Código SIGRA: colocar o código SIGRA presente na etiqueta do envelope menor da amostra. Observação: apenas letras maiúsculas e sem espaçamento entre os caracteres.
2. Código de rastreamento: colocar o código obtido através do registro da postagem da amostra na Agência dos Correios.
3. Responsável pelo preenchimento: colocar o responsável pelo preenchimento do formulário.

Figura 7 – Formulário UFSC de envio de amostra para sequenciamento



O formulário é dividido em seções. No topo, há uma barra de cabeçalho com o texto 'SAC - FAUNA' à esquerda, o logo 'LabTrans' no centro e o texto 'MINISTÉRIO DE PORTOS E AEROPORTOS' à direita. Abaixo, o título principal 'Enviar para Sequenciamento' é seguido por uma explicação: 'Encaminhar lote de amostras para realização do sequenciamento. Após essa etapa as amostras retornam e o próximo passo será o registro do resultado.' Abaixo disso, há uma seção com o texto 'Obrigado' e um ícone de nuvem. Seguem três campos de entrada de texto, cada um com um rótulo obrigatório em vermelho (*): 'Código SIGRA *', 'Código de rastreamento *' e 'Responsável pelo preenchimento *'. Cada campo contém o texto 'Sua resposta' e uma linha de entrada. Na base do formulário, há dois botões: 'Enviar' em um botão azul escuro e 'Limpar formulário' em um link azul claro.

SAC - FAUNA

LabTrans

MINISTÉRIO DE PORTOS E AEROPORTOS

Enviar para Sequenciamento

Encaminhar lote de amostras para realização do sequenciamento.
Após essa etapa as amostras retornam e o próximo passo será o registro do resultado.

Obrigado

Código SIGRA *

Sua resposta

Código de rastreamento *

Código de rastreamento da transportadora, para acompanhamento do transporte.

Sua resposta

Responsável pelo preenchimento *

Sua resposta

Enviar [Limpar formulário](#)

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

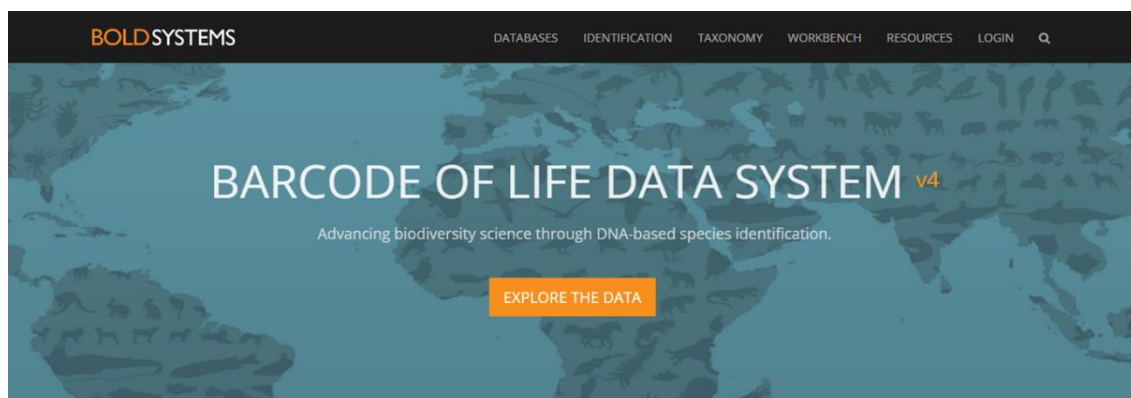
2.7 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Ao receber o resultado do sequenciamento, o laboratório deverá avaliar se foi possível sequenciar a amostra. Caso não tenha sido possível, o laboratório deverá preencher o Formulário UFSC de registro do resultado e selecionar a opção “Amostra inválida/sem utilidade para análise” na seção “*Databases for Sequences & Barcoding*”. Caso tenha sido possível, prosseguir com a identificação no *BOLD Systems*.

2.7.1 BOLD SYSTEMS²

Ao receber o cromatograma e as sequências, o laboratório deve realizar a identificação de cada amostra de forma individual no *BOLD Systems* (c2023). Na Figura 8, demonstra-se o *layout* da página inicial do *BOLD Systems*.

Figura 8 – Página inicial do *BOLD Systems*



DESIGNED TO SUPPORT THE GENERATION & APPLICATION OF DNA BARCODE DATA

BOLD is a cloud-based data storage and analysis platform developed at the Centre for Biodiversity Genomics in Canada. It consists of four main modules, a data portal, an educational portal, a registry of BINs (putative species), and a data collection and analysis workbench.

Fonte: *BOLD Systems* (c2023).

Ao acessar o *site* da plataforma *BOLD Systems*, deve-se clicar em “*identification*” na parte superior da tela, conforme sinalizado na Figura 9.

² Barcode of Life Data System.

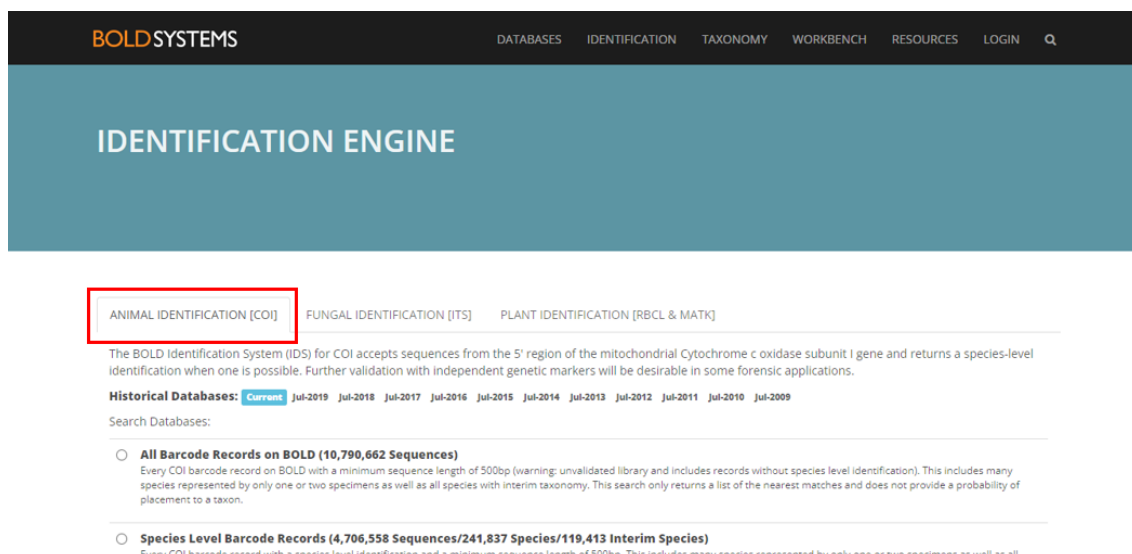
Figura 9 – Página inicial do *BOLD Systems* destacando o local para identificação

DESIGNED TO SUPPORT THE GENERATION & APPLICATION OF DNA BARCODE DATA

BOLD is a cloud-based data storage and analysis platform developed at the Centre for Biodiversity Genomics in Canada. It consists of four main modules, a data portal, an educational portal, a registry of BINs (putative species), and a data collection and analysis workbench.

Fonte: *BOLD Systems* (c2023). Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Já na aba de identificação, selecionar a área “*animal identification*”, como exposto na Figura 10. Posteriormente, selecionar “*species level barcode records*”, como sinalizado na Figura 11.

Figura 10 – Página de identificação do *BOLD Systems*

Fonte: *BOLD Systems* (c2023). Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Figura 11 – Página de identificação do *BOLD Systems*, destacando a aba para reconhecimento do nível de espécie

BOLD SYSTEMS DATABASES IDENTIFICATION TAXONOMY WORKBENCH RESOURCES LOGIN Q

ANIMAL IDENTIFICATION [COI] FUNGAL IDENTIFICATION [ITS] PLANT IDENTIFICATION [RBCL & MATK]

The BOLD Identification System (IDS) for COI accepts sequences from the 5' region of the mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I gene and returns a species-level identification when one is possible. Further validation with independent genetic markers will be desirable in some forensic applications.

Historical Databases: **Current** Jul-2019 Jul-2018 Jul-2017 Jul-2016 Jul-2015 Jul-2014 Jul-2013 Jul-2012 Jul-2011 Jul-2010 Jul-2009

Search Databases:

- All Barcode Records on BOLD (10,790,662 Sequences)**
Every COI barcode record on BOLD with a minimum sequence length of 500bp (warning: unvalidated library and includes records without species level identification). This includes many species represented by only one or two specimens as well as all species with interim taxonomy. This search only returns a list of the nearest matches and does not provide a probability of placement to a taxon.
- Species Level Barcode Records (4,706,558 Sequences/241,837 Species/119,413 Interim Species)**
Every COI barcode record with a species level identification and a minimum sequence length of 500bp. This includes many species represented by only one or two specimens as well as all species with interim taxonomy.
- Public Record Barcode Database (2,540,591 Sequences/154,113 Species/66,524 Interim Species)**
All published COI records from BOLD and GenBank with a minimum sequence length of 500bp. This library is a collection of records from the published projects section of BOLD.
- Full Length Record Barcode Database (3,114,222 Sequences/216,317 Species/95,370 Interim Species)**
Subset of the Species library with a minimum sequence length of 640bp and containing both public and private records. This library is intended for short sequence identification as it provides maximum overlap with short reads from the barcode region of COI.

Fonte: *BOLD Systems* (c2023).

Ao selecionar a aba de identificação de espécies, uma nova janela irá aparecer com um campo disponível para colocar a sequência de DNA obtida do sequenciamento da amostra. Deve-se pôr a sequência de DNA e clicar em “*submit*”, como exposto na Figura 12.

Figura 12 – Página de identificação do *BOLD Systems*, destacando a aba para depósito e submissão da sequência de DNA

BOLD SYSTEMS DATABASES IDENTIFICATION TAXONOMY WORKBENCH RESOURCES LOGIN Q

Enter fasta formatted sequences in the forward orientation:

```
TGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATAAGATTTTGAATATGCTCCCTCTTAACTTTATFAGTTTCAAGAAGTATAGTGAAAATGGGGCTGGAACAGGATGAAGTGTATCCCCC
TTATCTTCTGGGATTCATGCTGGGGCTTCTGTAGATTAGCTATTTTTCATTACATTTAGCAGAAATTTCTTATTTAGGAGCAGTAAATTTTACTACAGITATTAACATACGATCC
CCAGGAATTACTTATGATCGAATACCTTTATTTGTTGATCTGTAGTTAATCTGCAATTTTATTACTTTTATCTTAACTGTTTACCGGAGCTATTACAATCTTTAACTGATCGAAATTTAA
ATACTTCTTTTTGACCTGCGAGGAGGAGG
```

SUBMIT

Fonte: *BOLD Systems* (c2023). Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Ao submeter a sequência para a análise no banco de dados, uma nova janela surgirá, conforme evidenciado na Figura 13, e constará as seguintes informações: “*best ID*”, indicando a melhor identificação encontrada para a sequência depositada, e “*Top %*”, apontando a porcentagem de similaridade entre as sequências.

Segundo Hebert *et al.* (2003), a divergência genética entre espécies diferentes é maior que 3%, logo, valores de similaridade entre 97 e 100% ainda caracterizam organismos da mesma espécie. Portanto, serão aceitos valores maiores ou iguais a 98% de similaridade entre as sequências.

Figura 13 – Página do resultado da identificação do *BOLD Systems*, destacando as abas identificação e porcentagem de similaridade da espécie

Query ID	Best ID	Search DB	Tree	Top %	Graph	Low %
unlabeled_sequence	Anopheles bellator 2	COI SPECIES DATABASE		98.06		92.04

Query: unlabeled_sequence
Top Hit: Arthropoda Insecta - Diptera - Anopheles bellator 2 (98.06%)

Fonte: *BOLD Systems* (c2023). Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

2.7.2 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI)

Caso a identificação da sequência não ocorra no *BOLD Systems*, o laboratório deverá realizar a identificação na plataforma BLAST, disponível no NCBI (NIH, [2023]).

Ao entrar no *site* do BLAST, indicado na Figura 14, deverá ser selecionada a aba “*Nucleotide BLAST*” para realizar o depósito da sequência de DNA.

Figura 14 – Página inicial do NCBI destacando o local para identificação

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® Home Recent Results Saved Strategies Help

Basic Local Alignment Search Tool
BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide to nucleotide

blastx
translated nucleotide to protein

tblastn
protein to translated nucleotide

Protein BLAST
protein to protein

BLAST Genomes

Fonte: NCBI (NIH, [2023]). Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Já na página de identificação, deve-se indicar a sequência de DNA na aba “*Enter Query Sequence*”, como exposto na Figura 15. Posteriormente, selecionar “*BLAST*”.

Figura 15 – Página de identificação do BLAST, destacando as abas para depósito da sequência e da submissão

The image shows the BLAST search interface. The 'Enter Query Sequence' section is highlighted with a red box, showing a text input field containing a nucleotide sequence and a 'BLAST' button. The 'Choose Search Set' section is also highlighted with a red box, showing options for database, organism, and program selection.

Fonte: NCBI (NIH, [2023]). Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

Após a submissão, uma nova página surgirá com as informações da sequência, a identificação da espécie e a porcentagem de similaridade com as espécies. A primeira sequência a aparecer é a com maior porcentagem de similaridade. A Figura 16 evidencia os pontos a serem checados para identificação.

Figura 16 – Página do resultado da identificação no BLAST, destacando as abas identificação da espécie e porcentagem de similaridade da espécie

The image shows the BLAST results page. The 'Filter Results' section is highlighted with a red box, showing options for organism, percent identity, E value, and query coverage. The 'Sequences producing significant alignments' table is also highlighted with a red box, showing a list of sequences with their descriptions, scientific names, and accession numbers.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Anopheles anthropoaghus mitochondrion complete genome	Anopheles anthr...	2839	2839	100%	0.0	100.00%	15413	NC_057101.1
Anopheles sinensis isolate CQ-FR-6 mitochondrion complete genome	Anopheles sinen...	2523	2523	100%	0.0	96.29%	15413	MG816550.1
Anopheles sinensis isolate YN-FS-3 mitochondrion complete genome	Anopheles sinen...	2507	2507	100%	0.0	96.10%	15034	MG816585.1
Anopheles sinensis isolate CQ-FS-6 mitochondrion complete genome	Anopheles sinen...	2507	2507	100%	0.0	96.10%	15414	MG816556.1
Anopheles sinensis isolate CQ-FR-4 mitochondrion complete genome	Anopheles sinen...	2507	2507	100%	0.0	96.10%	15413	MG816548.1
Anopheles sinensis isolate CQ-FR-3 mitochondrion complete genome	Anopheles sinen...	2507	2507	100%	0.0	96.10%	15412	MG816547.1
Anopheles sinensis isolate AH-FR-2 mitochondrion complete genome	Anopheles sinen...	2507	2507	100%	0.0	96.10%	15413	MG816534.1

Fonte: NCBI (NIH, [2023]). Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

2.8 PREENCHIMENTO DO FORMULÁRIO UFSC DO RESULTADO

Após obtenção da espécie, o laboratório deverá preencher o formulário UFSC, informando o resultado encontrado para cada amostra. O formulário a ser preenchido é o “Registro do Resultado”, indicado na Figura 17.

No formulário, deverão ser preenchidas as seguintes informações:

1. Código SIGRA: código de identificação da amostra.
2. Responsável pelo preenchimento: responsável do laboratório por preencher o formulário.
3. *Databases for Sequences & Barcoding*: preencher qual plataforma foi utilizada para identificação da amostra, *BOLD Systems* ou NCBI, no GenBank. Em caso de não identificação, preencher o campo “Resultado inconclusivo”. Caso a amostra não tenha apresentado resultados bons no laboratório, não gerando uma sequência de DNA, preencher o campo “Amostra inválida/sem utilidade para análise”.
4. Resultado: preencher o nome científico obtido no banco de dados.
5. Resultados – Outros: caso o nome da espécie não esteja disponível na aba “Resultados”, digitar de forma manual nessa aba.
6. Arquivo Resultado: depositar nessa aba o laudo em formato .pdf.

Figura 17 – Formulário de preenchimento do registro do resultado

SAC - FAUNA

LabTrans

MINISTÉRIO DE PORTOS E AEROPORTOS

Registro do Resultado

A foto e o nome associados à sua Conta do Google serão registrados quando você fizer upload de arquivos e enviar este formulário.. Seu e-mail não faz parte da resposta.

***Obrigatório**

Código SIGRA *

Sua resposta

Responsável pelo preenchimento *

Sua resposta

Databases for Sequences & Barcoding *

1. Bold Systems

2. NCBI no GenBank

3. Resultado inconclusivo

4. Amostra inválida / sem utilidade para análise

Resultado *

Escolher

Resultado - Outros

Sua resposta

Arquivo Resultado *

[Adicionar arquivo](#)

Enviar [Limpar formulário](#)

Elaboração: LabTrans/UFSC (2023)

REFERÊNCIAS

BOLD SYSTEMS. **Homepage**. [Ottawa], c2023. Disponível em: <https://www.boldsystems.org/>. Acesso em: 22 mar. 2023.

CARVALHO, C. B. V. de; FASSIO, L. H.; PARANAÍBA, R. T. F. de. Investigação de Colisões entre Aves e Aeronaves no Brasil com o Uso do DNA Barcoding. **Revista de Estudos Ambientais**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 71-79, 15 abr. 2020. Disponível em: <https://bu.furb.br/ojs/index.php/rea/article/view/8312/5482>. Acesso em: 22 mar. 2023.

CENTRO DE INVESTIGAÇÃO E PREVENÇÃO DE ACIDENTES AERONÁUTICOS (CENIPA). **Anuário de Risco de Fauna**: 2011-2020. Brasília, DF: CENIPA, 2021. Disponível em: <https://www2.fab.mil.br/cenipa/index.php/estatisticas/risco-da-fauna?download=220:anuario-de-risco-de-fauna-2011-2021>. Acesso em: 4 jan. 2023.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 270, n. 1.512, p. 313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS biology**, [s. l.], v. 2(10), 2004. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0020312>. Acesso em: 4 jan. 2023.

LI, J. *et al.* Applying DNA barcoding to conservation practice: a case study of endangered birds and large mammals in China. **Biodiversity and Conservation**, Springer Netherlands, v. 26, n. 3, p. 653-668, 2017.

LOPEZ, I.; ERICKSON, D. L. **DNA Barcodes: Methods and Protocols**. [S. l.]: Humana Press, 23 Aug. 2016.

MARQUES, C. G. **Relações Genéticas em Espécies de Camarões Peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) de Ocorrência no Litoral Brasileiro**. 2015. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/8764/TeseCGM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 mar. 2023.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NIH). National Center for Biotechnology Information (NCBI). Blast. **Sus scrofa (pig) Nucleotide BLAST**. Bethesda, [2023]. Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=OGP__9823__10718. Acesso em: 22 mar. 2023.

W, J. K. *et al.* DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, [s. l.], n. 30 (1), p. 25-35, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468359/>. Acesso em: 4 jan. 2023.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo da Metodologia dos 7 Passos	4
Figura 2 – Formulário UFSC para preenchimento do recebimento do lote	5
Figura 3 – <i>Dashboard</i> de acompanhamento	6
Figura 4 – Dashboard de acompanhamento ressaltando o código da amostra	7
Figura 5 – Envelope da amostra	7
Figura 6 – Formulário UFSC de amostra extraviada	9
Figura 7 – Formulário UFSC de envio de amostra para sequenciamento	13
Figura 8 – Página inicial do <i>BOLD Systems</i>	14
Figura 9 – Página inicial do <i>BOLD Systems</i> destacando o local para identificação	15
Figura 10 – Página de identificação do <i>BOLD Systems</i>	15
Figura 11 – Página de identificação do <i>BOLD Systems</i> , destacando a aba para reconhecimento do nível de espécie	16
Figura 12 – Página de identificação do <i>BOLD Systems</i> , destacando a aba para depósito e submissão da sequência de DNA	16
Figura 13 – Página do resultado da identificação do <i>BOLD Systems</i> , destacando as abas identificação e porcentagem de similaridade da espécie	17
Figura 14 – Página inicial do NCBI destacando o local para identificação	17
Figura 15 – Página de identificação do BLAST, destacando as abas para depósito da sequência e da submissão	18
Figura 16 – Página do resultado da identificação no BLAST, destacando as abas identificação da espécie e porcentagem de similaridade da espécie	18
Figura 17 – Formulário de preenchimento do registro do resultado	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes e suas respectivas quantidades para amplificação do marcador molecular na reação de PCR de uma amostra	11
Tabela 2 – Protocolo de temperatura para amplificação do marcador molecular.....	11
Tabela 3 – Reagentes e quantidades necessárias para confecção de gel de agarose 1% (exemplo para um gel de 40 ml)	12

LISTA DE SIGLAS

<i>BOLD Systems</i>	<i>Barcode of Life Data Systems</i>
COI	<i>Citocromo C Oxidase I</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ICAO	International Civil Aviation Organization
LabTrans	Laboratório de Transportes e Logística
NCBI	National Center for Biotechnology
PCR	Information Reação em cadeia da polimerase
SAC	Secretaria Nacional de Aviação Civil
SIGRA	Sistema de Gerenciamento de Risco Aviário
TBE	<i>Tris-Borate-EDTA</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

MARÇO/2023



MINISTÉRIO DE
**PORTOS E
AEROPORTOS**

Secretaria Nacional de Aviação Civil