ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE

DIVERSIDADE DE INSETOS EM DIFERENTES CONTEXTOS AMBIENTAIS: IMPLICAÇÕES PARA A BIODIVERSIDADE E A ECOLOGIA DA RESTAURAÇÃO.

Por

CLIDECIR NICOLAS SAMPAIO LIMA

TAUBATÉ-SP, 2026

ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE

DIVERSIDADE DE INSETOS EM DIFERENTES CONTEXTOS AMBIENTAIS: IMPLICAÇÕES PARA A BIODIVERSIDADE E A ECOLOGIA DA RESTAURAÇÃO.

Por

CLIDECIR NICOLAS SAMPAIO LIMA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

PEDRO MIGUEL DA COSTA PEDRO
MILENA DROPA
LETÍCIA BENAVALLI

TRABALHO FINAL APRESENTADO AO PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

IPÊ – INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS
Nazaré Paulista, 2026

Ficha Catalográfica

Sampaio Lima, Clidecir Nicolas

Diversidade de insetos em diferentes contextos ambientais: implicações para a biodiversidade e a ecologia da restauração, 2026. 67 pp.
Trabalho Final (mestrado): IPÊ – Instituto de Pesquisas ecológicas

Restauração Ecológica
Saúde única
Bioindicadores
Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade, IPÊ

Nazaré Paulista - SP, 17 de Setembro de 2026

Pedro Miguel da Costa Pedro

_____

Prof. Dr.

Eduardo Humberto Ditt

_____

Prof. Dr.

MIlena Dropa

_____

Prof. Dr.

"A natureza não é um tecido externo que apenas observamos: somos um fio intrínseco de sua teia. Quando nos dissolvemos na quietude de uma floresta, percebemos que a respiração das árvores e a nossa são uma só. Tudo o que fizermos à terra, faremos a nós mesmos, pois todas as coisas estão ligadas como o sangue que une uma família, compartilhando, afinal, o mesmo Ser."

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu amigo e colega de profissão, Luis Muti, pela confiança e indicação fundamentais para que esta trajetória se iniciasse.

Ao meu orientador, Pedro Miguel da Costa Pedro, o meu mais sincero muito obrigado por ter me aceitado e acolhido neste projeto. Quero expressar uma gratidão especial pela sua imensa paciência, empatia e apoio diante dos imprevistos que surgiram ao longo do mestrado. Obrigado por me guiar com excelência, mesmo nos momentos em que os prazos se tornaram um grande desafio.

Estendo meus sinceros agradecimentos às minhas coorientadoras, Milena Dropa e Letícia Benavalli, por todo o suporte técnico e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda a equipe do IPÊ, deixo o meu reconhecimento por todo o apoio e estrutura oferecidos ao longo do projeto, tanto nas atividades em Nazaré Paulista quanto durante as etapas no Pontal do Paranapanema. Agradeço também ao **AstraZeneca Forest Reforestation Program** pelo apoio financeiro, que viabilizou a realização deste mestrado e o desenvolvimento do projeto de pesquisa que deu origem a esta dissertação.

Este trabalho também não seria possível sem a colaboração essencial da comunidade local. Meu profundo agradecimento aos moradores que gentilmente abriram as portas de suas propriedades e nos permitiram realizar as coletas de campo, bem como a todas as pessoas que atuaram como ponte e intermediaram esse contato tão importante.

Por fim, agradeço imensamente à minha família. O apoio incondicional e o incentivo constante de vocês foram a base que me sustentou e me permitiu chegar até a conclusão de mais esta etapa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS 08
LISTA DE FIGURAS 09
RESUMO 10
ABSTRACT 11

1. INTRODUÇÃO 12
2. REFERENCIAL TEÓRICO 14
   2.1. O desafio de monitorar a recuperação dos ecossistemas..... 14
   2.2. Indicadores tradicionais e suas limitações 15
   2.3. A revolução molecular no monitoramento ecológico 15
   2.4. Do monitoramento da restauração à vigilância molecular 17
   2.5. Diptera como indicadores ecológicos e epidemiológicos no contexto de One Health……19
   2.6. A importância ecológica e epidemiológica dos flebotomíneos…….....23
   2.7. Gradientes ecológicos e padrões de diversidade...……24
   2.8. Desafios da identificação morfológica e a ascensão das ferramentas moleculares……..……..……25
   2.9.Métodos baseados em DNA para restauração e vigilância epidemiológica……..…..……26
   2.10. Integrando a restauração ecológica e a vigilância epidemiológica…...27
   2.11. Métodos baseados em DNA como uma solução integrativa……...…..28
   2.12. Diptera como modelo para monitoramento molecular integrativo…..…28
3. JUSTIFICATIVA 29
4. OBJETIVOS 30
5. CONTRIBUIÇÕES ESPERADAS……..30
6. MÉTODOS 31
   6.1. Área de estudo 31
   6.2. Amostragem e preservação de insetos 32
   6.3. Extração de DNA e PCR 33
   6.3.1. Validação in silico da especificidade dos primers……34

6.4. Bioinformática e análise de dados……..35
6.5. Validação de Bioindicadores por Reanálise de Dados Secundários……36
6.6. Perspectivas Metodológicas: Teste Piloto com Armadilhas CDC de Baixo Custo……...36

7. RESULTADOS 38
7.1. Especificidade de anelamento e fidelidade taxonômica in silico 38
7.2 Estruturação ecológica da composição de OTUs e ZOTUs (NMDS e PERMANOVA) 39
7.3. Diversidade Alfa: Efeito da Resolução Molecular (100% vs. 97%) 39
7.4. Espécies Indicadoras e a Resposta ao Filtro Ambiental 43
7.5. Validação de Diptera como Bioindicador de Alta Resolução 47
7.6 Avaliação do desempenho das armadilhas CDC não comerciais 49
8. DISCUSSÃO 50
8.1. A estruturação das comunidades e o papel das áreas em restauração ……... 50
8.2 Impacto da resolução molecular (OTU vs. ZOTU) 50
8.3. Robustez molecular e especificidade taxonômica dos marcadores 51
8.4. Filtros ambientais e a autoecologia dos indicadores de Psychodidae …51
8.5. Diptera como bioindicador sensível e viabilidade metodológica……...52
8.6. Limitações do Estudo e Perspectivas Futuras……..……..53
9. CONCLUSÃO 54
10. REFERÊNCIAS 54

11. GLOSSÁRIO……...69

LISTA DE TABELAS

Tabela página

Tabela 1. Linhagens indicadoras da família Psychodidae identificadas via metabarcoding no Pontal do Paranapanema, incluindo resolução taxonômica, classificação ao nível de gênero, valores de IndVal e significância estatística. ……47

LISTA DE FIGURAS

Figura página

Figura 01. Mapa da área de estudo e distribuição dos pontos amostrais no Pontal do Paranapanema, São Paulo, Brasil……..……33

Figura 02. Instalação de armadilhas CDC……..….34

Figura 03. Protótipo de armadilha luminosa de sucção de baixo custo construída para o teste piloto…….39

Figura 4. Análise de conservação e especificidade in silico para o primer...……..41

Figura 5. Ordenação NMDS evidenciando a segregação espacial das assembleias de Psychodidae entre os habitats em resolução OTU (97%).....43

Figura 6. Ordenação NMDS evidenciando a segregação espacial das assembleias de Psychodidae entre os habitats em resolução ZOTU (100%).....44

Figura 7. Diversidade alfa das assembleias de Psychodidae baseada na resolução máxima de sequências (ZOTUs a 100% de similaridade).....45

Figura 8. Diversidade alfa das assembleias de Psychodidae calculada a partir do agrupamento em OTUs (97% de similaridade).....46

Figura 9. Ordenação NMDS evidenciando a diferenciação sazonal global da comunidade total de artrópodes…….50

Figura 10. Ordenação NMDS comparativa evidenciando a diferenciação sazonal das comunidades de Diptera e Lepidoptera…….51

Figura 11. Protótipo de armadilha CDC não comercial em operação e o resultado de suas capturas……...52

RESUMO

Resumo do Trabalho Final apresentado ao Programa de Mestrado Profissional em Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

DIVERSIDADE DE INSETOS EM DIFERENTES CONTEXTOS AMBIENTAIS: IMPLICAÇÕES PARA A BIODIVERSIDADE E A ECOLOGIA DA RESTAURAÇÃO..

Por

CLIDECIR NICOLAS SAMPAIO LIMA

Agosto de 2026

Orientador: Prof. Dr. Pedro Miguel da Costa Pedro

As mudanças ambientais e a degradação de habitats impulsionam a perda de biodiversidade e o risco de emergência de zoonoses, exigindo ferramentas eficazes para avaliar o sucesso da restauração ecológica. Este estudo avaliou a diversidade de insetos (focando na família Psychodidae) ao longo de um gradiente de antropização — composto por áreas de floresta protegida, ecossistemas em restauração e matriz urbana — na região do Pontal do Paranapanema, São Paulo. Adicionalmente, buscou-se validar a eficácia de armadilhas luminosas não comerciais de baixo custo acopladas ao *metabarcoding* de DNA. As comunidades foram caracterizadas utilizando duas resoluções moleculares: ZOTUs (100% de similaridade) e OTUs (97%). A análise de diversidade beta revelou uma profunda reestruturação espacial das assembleias, com as áreas restauradas a ocuparem uma posição sucessional intermediária entre a floresta preservada e o ambiente com impacto humano. A Análise de Espécies Indicadoras (ISA) destacou linhagens bioindicadoras exclusivas, evidenciando que as áreas em restauração estão a resgatar e sustentar uma biodiversidade florestal especialista. O teste piloto comprovou que as armadilhas de baixo custo apresentam desempenho comparável aos modelos padronizados, enquanto a análise de táxons demonstrou a superioridade explicativa da ordem Diptera face a outros grupos clássicos (Lepidoptera). Conclui-se que a integração de ferramentas moleculares com tecnologias de amostragem acessíveis constitui uma estratégia sensível e escalável, essencial para monitorizar a resiliência ecológica e apoiar políticas de Saúde Única (*One Health*).

ABSTRACT

Abstract of the Final Project presented to the Professional Master's Program in Biodiversity Conservation and Sustainable Development as a partial requirement for obtaining the degree of Master.

INSECT DIVERSITY IN DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONTEXTS: IMPLICATIONS FOR BIODIVERSITY AND RESTORATION ECOLOGY

By

Clidecir Nicolas Sampaio Lima

August 2026

Supervisor: Pedro Miguel da Costa Pedro

Environmental changes and habitat degradation drive biodiversity loss and increase the risk of zoonotic disease emergence, requiring effective tools to assess the success of ecological restoration. This study evaluated insect diversity (focusing on the family Psychodidae) along an anthropization gradient — composed of protected forest areas, ecosystems under restoration, and an urban matrix — in the Pontal do Paranapanema region, São Paulo, Brazil. Additionally, the study sought to validate the effectiveness of low-cost, non-commercial light traps coupled with DNA metabarcoding. Communities were characterized using two molecular resolutions: ZOTUs (100% similarity) and OTUs (97%). Beta diversity analysis revealed a profound spatial restructuring of assemblages, with restored areas occupying an intermediate successional position between preserved forest and human-impacted environments. Indicator Species Analysis (ISA) highlighted exclusive bioindicator lineages, demonstrating that restoration areas are recovering and sustaining specialist forest biodiversity. The pilot test confirmed that low-cost traps performed comparably to standardized models, while taxonomic analyses demonstrated the superior explanatory power of the order Diptera compared to other classical groups (Lepidoptera). It is concluded that the integration of molecular tools with accessible sampling technologies constitutes a sensitive and scalable strategy, essential for monitoring ecological resilience and supporting One Health policies.

1. INTRODUÇÃO

As mudanças ambientais induzidas pelo homem estão remodelando a biosfera a uma taxa sem precedentes. Ao longo do último século, a aceleração da atividade industrial, a expansão agrícola, o desmatamento e a urbanização impulsionaram transformações profundas nos sistemas ecológicos, alterando padrões de biodiversidade e o funcionamento de ecossistemas em todo o planeta. Essa convergência de pressões antropogênicas define o que hoje é amplamente reconhecido como o Antropoceno — um período histórico no qual a atividade humana se tornou a força dominante que influencia os processos ecológicos e climáticos da Terra (Steffen et al., 2015; Rockström et al., 2009; Crutzen & Stoermer, 2000). As consequências são extensas: perda de habitat, extinção de espécies, instabilidade climática e perturbações biogeoquímicas ameaçam a integridade dos sistemas naturais que sustentam a sobrevivência humana (Díaz et al., 2019; IPBES, 2019).

Em ecossistemas tropicais, onde se concentra a maior parte da biodiversidade global, essas pressões geram efeitos em cascata. A conversão de florestas em paisagens agrícolas ou urbanas não apenas reduz a riqueza de espécies, mas também altera as interações entre elas, a diversidade funcional e a resiliência ecológica (Chazdon, 2014). A fragmentação modifica condições microclimáticas, reduz a conectividade de habitats e interrompe dinâmicas tróficas, prejudicando serviços ecossistêmicos essenciais, como polinização, estabilização do solo, ciclagem de nutrientes e regulação climática (Gardner et al., 2009; Haddad et al., 2015). Notavelmente, essas transformações frequentemente aumentam o risco de doenças zoonóticas e transmitidas por vetores, vinculando diretamente a degradação ambiental à saúde pública (Keesing et al., 2010; Allen et al., 2017; Bezerra-Santos et al., 2023).

A degradação do habitat e as mudanças no uso da terra alteram profundamente o funcionamento ecológico ao simplificar a estrutura das comunidades, interromper interações tróficas e reduzir a redundância funcional nos ecossistemas. A perda e a fragmentação de habitats naturais frequentemente levam ao declínio de espécies especialistas e predadores, favorecendo generalistas tolerantes a distúrbios, remodelando, assim, as teias alimentares e processos biogeoquímicos, como o fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes (Foley et al., 2005; Haddad et al., 2015). Essas mudanças estruturais e funcionais podem ter consequências em cascata para a

regulação do ecossistema, incluindo a dinâmica de vetores de doenças e hospedeiros reservatórios.

Importantemente, em paisagens degradadas, reduções na biodiversidade e na complexidade ecológica frequentemente promovem a dominância de vetores ou hospedeiros altamente competentes, aumentando o potencial de transmissão de patógenos e a exposição humana a zoonoses (Patz et al., 2004; Keesing et al., 2010). Como resultado, a degradação do habitat não apenas compromete a integridade do ecossistema, mas também amplifica os riscos à saúde humana ao alterar os mecanismos ecológicos que regulam a emergência e a propagação de doenças.

À medida que cresce a conscientização sobre esses desafios, a restauração ecológica surge como uma estratégia central para reverter a degradação ambiental, recuperar a biodiversidade e restaurar as funções ecossistêmicas. Iniciativas globais, como a Década das Nações Unidas da Restauração de Ecossistemas (2021–2030), o Desafio de Bonn e programas nacionais de reflorestamento, enfatizam a restauração como um pilar do desenvolvimento sustentável (Chazdon et al., 2017; PNUMA, 2020). A restauração visa não apenas recuperar a biodiversidade nativa, mas também reestabelecer processos ecológicos que sustentam serviços ecossistêmicos, aumentam a resiliência e contribuem para o bem-estar humano (Gann et al., 2019; McDonald et al., 2016).

No entanto, apesar da implementação disseminada, a eficácia das intervenções de restauração continua sendo difícil de avaliar. Determinar se os ecossistemas estão realmente se recuperando exige estruturas de monitoramento robustas, capazes de quantificar mudanças na biodiversidade, estrutura e função ao longo do tempo. As abordagens tradicionais de monitoramento, embora informativas, frequentemente dependem de trabalho de campo intensivo e conhecimento taxonômico especializado, limitando sua escalabilidade e comparabilidade entre diferentes locais (Ruiz-Jaen & Aide, 2005; Wortley et al., 2013). Essas restrições impulsionaram a busca por métodos inovadores, padronizados e de alto rendimento (*high-throughput*) que possam fornecer indicadores confiáveis do sucesso da restauração (Liddicoat et al., 2022; van der Heyde et al., 2022; Allen et al., 2024).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O desafio de monitorar a recuperação dos ecossistemas

Avaliar o sucesso da restauração tem sido reconhecido como um dos aspectos mais complexos e subdesenvolvidos da restauração ecológica (Ruiz-Jaen & Aide, 2005; Wortley et al., 2013). O monitoramento tradicional baseia-se fortemente na estrutura da vegetação, riqueza de espécies e métricas de abundância, muitas vezes restritas a um conjunto limitado de táxons indicadores, como plantas, aves ou borboletas (McDonald et al., 2016; Gann et al., 2019). Embora essas métricas possam capturar certos aspectos da recuperação, elas frequentemente negligenciam grupos de invertebrados crípticos ou funcionalmente importantes — particularmente insetos do solo e terrestres — que desempenham papéis fundamentais na ciclagem de nutrientes, regulação trófica e resiliência dos ecossistemas (Lavelle et al., 2006; Bohan et al., 2017; Caruso et al., 2019). Capturar essas dinâmicas exige não apenas uma cobertura taxonômica mais ampla, mas também um aumento no esforço e na eficiência de amostragem para representar adequadamente a alta diversidade e a heterogeneidade espacial das comunidades de invertebrados em paisagens restauradas.

Além disso, tais métodos demandam muito tempo, dependem de uma escassa expertise taxonômica e são difíceis de replicar em amplas escalas espaciais (Bohan et al., 2017; Bush et al., 2017). Como a restauração ocorre em paisagens e intervalos de tempo heterogêneos, indicadores de monitoramento padronizados são necessários para comparar trajetórias, avaliar a recuperação funcional e orientar o manejo adaptativo (Ruiz-Jaen & Aide, 2005; Gann et al., 2019). Cada vez mais, ecólogos estão recorrendo a abordagens integrativas que combinam observações de campo, sensoriamento remoto e dados moleculares para avaliar as mudanças ecológicas com maior precisão (Bush et al., 2017; van der Heyde et al., 2022).

2.2 Indicadores tradicionais e suas limitações

As primeiras avaliações de restauração enfatizavam a vegetação como um indicador (*proxy*) da condição ecológica, utilizando métricas como fechamento do dossel, área basal e similaridade de espécies com áreas de referência (Ruiz-Jaen & Aide, 2005; Wortley et al., 2013). Embora a estrutura da vegetação influencie fortemente a função do ecossistema, ela nem sempre se correlaciona com a recuperação faunística ou

microbiana (Majer, 2009; Nichols & Watkinson, 2020). Por exemplo, assembleias de artrópodes do solo e polinizadores frequentemente respondem de forma mais lenta à restauração do que as plantas, refletindo diferenças na capacidade de dispersão e nos requisitos de habitat (Hernández-Ortiz et al., 2020).

Portanto, o sucesso da restauração deve ser avaliado de forma multi-trófica — isto é, abrangendo plantas, invertebrados, vertebrados e microrganismos (Chazdon, 2014; Gann et al., 2019). No entanto, o monitoramento de múltiplos grupos com métodos de campo convencionais torna-se rapidamente inviável do ponto de vista logístico, especialmente em ecossistemas tropicais biodiversos, onde a maioria das espécies permanece não descrita (Mora et al., 2011). Esse "gargalo taxonômico" levou ao crescente interesse em técnicas moleculares que podem identificar espécies ou comunidades inteiras usando apenas vestígios de DNA (Taberlet et al., 2012; Thomsen & Willerslev, 2015).

2.3 A revolução molecular no monitoramento ecológico

Ferramentas moleculares baseadas no sequenciamento de DNA transformaram o monitoramento ecológico ao permitir a caracterização rápida e padronizada de comunidades biológicas inteiras em múltiplos níveis tróficos. Na ecologia da restauração, essas abordagens são cada vez mais aplicadas a amostras biológicas em massa (*bulk samples*) — como núcleos de solo, serapilheira, coletas de armadilhas *pitfall*, armadilhas Malaise ou assembleias mistas de invertebrados — onde os organismos são fisicamente coletados e identificados via DNA em vez de apenas morfologia (Taberlet et al., 2012; Elbrecht & Leese, 2015). Ao acoplar tais amostras ao sequenciamento de alto rendimento (*high-throughput sequencing*) e marcadores genéticos universais (por exemplo, o mitocondrial *cox1* para animais ou marcadores ribossomais para microrganismos), o metabarcoding permite a identificação simultânea de centenas de táxons de microrganismos, invertebrados e vertebrados, muitos dos quais seriam difíceis ou impraticáveis de identificar morfologicamente.

Os insetos são indicadores particularmente informativos do sucesso da restauração porque respondem rapidamente a mudanças na estrutura do habitat, complexidade da vegetação, microclima e disponibilidade de recursos, integrando processos

ecológicos tanto acima quanto abaixo do solo. Estudos de metabarcoding de amostras em massa em campos, florestas e paisagens pós-industriais restauradas mostraram que a composição da comunidade de insetos muda de forma previsível ao longo de gradientes sucessionais, muitas vezes convergindo para assembleias de referência à medida que a restauração progride (Elbrecht et al., 2017; Liddicoat et al., 2022). Essas respostas frequentemente precedem mudanças detectáveis nas comunidades de vertebrados ou na composição de plantas, destacando a sensibilidade dos insetos como indicadores precoces da recuperação ecológica.

No contexto da restauração, o metabarcoding de insetos tem demonstrado superar o monitoramento baseado em morfologia na detecção de táxons crípticos, espécies raras e diferenças de composição em escala fina entre locais. Por exemplo, o metabarcoding de amostras de artrópodes revelou diferenças distintas entre habitats restaurados e degradados que não eram aparentes apenas pela triagem taxonômica grosseira, melhorando a capacidade de discriminar entre tratamentos e estágios de restauração (Elbrecht & Leese, 2015; Ji et al., 2013). Tal resolução é particularmente importante para avaliar a recuperação funcional, uma vez que as assembleias de insetos sustentam processos ecossistêmicos fundamentais, incluindo decomposição, polinização, herbivoria e regulação trófica.

Apesar de suas vantagens, o metabarcoding de insetos também apresenta desafios metodológicos. O viés de iniciadores (*primer bias*) pode levar à amplificação desigual entre táxons, as bases de dados de referência permanecem incompletas para muitos grupos de insetos tropicais, e a abundância de leituras de sequência (*reads*) fornece apenas um substituto semiquantitativo para a abundância ou biomassa orgânica (Song et al., 2008; Elbrecht & Leese, 2015). Consequentemente, as melhores práticas na ecologia da restauração envolvem a integração do metabarcoding de amostras em massa com amostragem de campo padronizada, medições de habitat e indicadores ecológicos complementares. Quando aplicado dentro deste framework integrativo, o metabarcoding focado em insetos oferece uma abordagem poderosa e escalável para avaliar os resultados da restauração e a integridade ecológica em escalas espaciais e temporais.

2.4. Do monitoramento da restauração à vigilância molecular

As mesmas transformações ambientais que impulsionam a perda de biodiversidade frequentemente modificam as interações hospedeiro-vetor-patógeno, influenciando a distribuição e a emergência de doenças infecciosas (Patz et al., 2004; Keesing et al., 2010; Bezerra-Santos et al., 2023). O desmatamento, a fragmentação de habitats e o avanço urbano aumentam o contato entre humanos, animais domésticos e reservatórios selvagens, facilitando eventos de transbordamento zoonótico (*zoonotic spillover*) (Rohr et al., 2020; Allen et al., 2017). Por outro lado, restaurar a integridade ecológica pode mitigar o risco de doenças ao aumentar a diversidade da comunidade e a complexidade trófica — um mecanismo frequentemente descrito como o efeito de diluição (Civitello et al., 2015).

No Brasil, diversos sistemas de doenças bem documentados ilustram como a integridade do ecossistema e a biodiversidade podem influenciar o risco de doenças zoonóticas. No bioma Mata Atlântica, análises em larga escala mostraram que municípios com maior cobertura florestal e paisagens mais intactas tendem a exibir menor incidência de múltiplas zoonoses, incluindo a síndrome pulmonar por hantavírus, leishmanioses visceral e cutânea e a febre maculosa brasileira. Áreas associadas à conservação de longo prazo e redução do desmatamento — como Terras Indígenas — frequentemente mantêm níveis mais elevados de integridade de habitat e diversidade de vertebrados e invertebrados, o que pode limitar a dominância de hospedeiros reservatórios e vetores altamente competentes, reduzindo assim a transmissão de patógenos para humanos (Civitello et al., 2015). Esses padrões sustentam a ideia de que comunidades ecológicas diversas podem amortecer o risco de doenças ao regular as interações hospedeiro-vetor e manter estruturas tróficas complexas.

Evidências de doenças transmitidas por vetores apoiam ainda mais essa relação. Na Amazônia brasileira, o desmatamento tem sido consistentemente associado ao aumento do risco de malária, particularmente durante os estágios iniciais e intermediários da perda florestal. Uma revisão sistemática abrangente demonstrou que a supressão da floresta altera a composição da comunidade de mosquitos e os habitats de reprodução, muitas vezes favorecendo espécies de *Anopheles* que são vetores de malária altamente competentes, enquanto reduz a diversidade geral de mosquitos (Olson et al., 2010). Essa mudança em direção a comunidades de vetores

simplificadas aumenta a exposição humana e a eficiência da transmissão, ilustrando como a perda de biodiversidade e a perturbação do ecossistema podem elevar o risco de doenças em vez de suprimi-lo.

Dinâmicas semelhantes foram relatadas para doenças transmitidas por carrapatos no sudeste do Brasil. Estudos que examinaram a febre maculosa brasileira em paisagens fragmentadas de Mata Atlântica encontraram associações entre a fragmentação do habitat, mudanças na composição da comunidade de hospedeiros (ex: proliferação de capivaras e outros hospedeiros competentes) e o aumento da ocorrência da doença. Essas descobertas indicam que a simplificação da paisagem e a perda da regulação ecológica podem amplificar a transmissão de patógenos ao favorecer espécies hospedeiras que mantêm e espalham patógenos de forma eficiente, enquanto ecossistemas mais complexos e intactos podem restringir tais processos (Barros et al., 2017; Civitello et al., 2015).

Em conjunto, esses estudos de caso brasileiros demonstram que restaurar ou conservar a integridade ecológica tem o potencial de mitigar o risco de doenças ao sustentar comunidades biológicas diversas e interações tróficas que limitam a amplificação de patógenos. Embora as respostas das doenças dependam do contexto e nem todos os sistemas se conformem estritamente às previsões do efeito de diluição, as evidências disponíveis no Brasil apoiam a conclusão mais ampla de que a conservação da biodiversidade e a restauração de ecossistemas podem contribuir para benefícios à saúde pública.

Apesar dessas ligações, a ecologia da restauração e a vigilância epidemiológica têm operado tradicionalmente de forma paralela, e não em sinergia. No entanto, o monitoramento baseado em DNA oferece uma oportunidade sem precedentes para integrar ambos os domínios sob a abordagem de Saúde Única (*One Health*), onde a saúde dos ecossistemas e a saúde humana são tratadas como componentes interconectados do mesmo sistema socioecológico (Destoumieux-Garzón et al., 2018). O metabarcoding e ensaios de patógenos direcionados podem detectar simultaneamente vetores, hospedeiros e patógenos em um único fluxo de trabalho, gerando dados de alerta precoce para mudanças na composição de vetores ou reservatórios associadas à mudança no uso da terra (Hernández-Triana et al., 2021; Kocher et al., 2023).

Essa abordagem integrativa — por vezes referida como vigilância molecular — permite a vigilância em multiescala da biodiversidade e do risco de doenças. Por exemplo, projetos de metabarcoding de mosquitos demonstraram a viabilidade de detectar tanto as espécies de vetores quanto o RNA arboviral a partir de amostras de armadilhas em massa, oferecendo um modelo escalável para outros grupos de vetores. Ao vincular dados ecológicos e epidemiológicos, a vigilância baseada em DNA transforma o monitoramento da biodiversidade de um empreendimento puramente ecológico em uma ferramenta interdisciplinar para a gestão ambiental e a saúde pública.

2.5 Diptera como indicadores ecológicos e epidemiológicos no contexto de One Health

Diptera representa uma das ordens de insetos mais diversas e ecologicamente importantes, compreendendo mais de 150.000 espécies descritas distribuídas em praticamente todos os ecossistemas terrestres e de água doce do planeta, com muitas outras espécies ainda não formalmente descritas (Grimaldi & Engel, 2005; Yeates & Wiegmann, 2005; Marshall, 2006; Yeates et al., 2007; Stork, 2018). Essa extraordinária diversidade reflete uma longa história evolutiva e uma ampla variedade de adaptações ecológicas que permitem aos dípteros ocupar praticamente todos os níveis tróficos e tipos de habitat, incluindo copas florestais, solos e serrapilheira, ambientes aquáticos e paisagens fortemente modificadas pelo ser humano (Yeates & Wiegmann, 2005; Marshall, 2006; Adler & Courtney, 2019). Em decorrência dessa ampla distribuição ecológica, os dípteros constituem um componente significativo da biodiversidade global de insetos e desempenham papéis fundamentais no funcionamento dos ecossistemas (Yeates & Wiegmann, 2005; Adler & Courtney, 2019).

As espécies de Diptera participam de uma ampla variedade de processos ecológicos, incluindo decomposição, ciclagem de nutrientes, polinização, predação, parasitismo e transferência de energia nas cadeias tróficas (Marshall, 2006; Ssymank et al., 2008; Adler & Courtney, 2019). As larvas de numerosas famílias apresentam hábitos detritívoros ou saprófagos, alimentando-se de material vegetal em decomposição, carcaças, fungos e resíduos orgânicos, acelerando assim a decomposição da matéria orgânica e facilitando a reciclagem de nutrientes em ecossistemas terrestres e

aquáticos (Rusek, 1984; Marshall, 2006; Adler & Courtney, 2019). Em muitos ambientes, as larvas de dípteros representam uma parte significativa da macrofauna do solo e das comunidades de invertebrados aquáticos, conectando recursos detritais com níveis tróficos superiores e contribuindo para a produtividade dos ecossistemas (Rusek, 1984; Curry & Good, 1992; Adler & Courtney, 2019).

Além de seu papel na decomposição, diversos grupos de dípteros atuam como importantes polinizadores em ecossistemas naturais e agrícolas. As moscas-das-flores (Syrphidae), por exemplo, são reconhecidas como importantes polinizadoras de plantas silvestres e culturas agrícolas, podendo desempenhar um papel essencial em sistemas onde as abelhas são escassas ou apresentam limitações sazonais (Ssymank et al., 2008; Orford et al., 2015; Rader et al., 2016). A polinização por dípteros pode ser particularmente relevante em ambientes temperados, alpinos ou em períodos iniciais da estação de floração, nos quais moscas podem representar uma parcela significativa das visitas de polinizadores (Ssymank et al., 2008; Orford et al., 2015). Além disso, as larvas de vários táxons de dípteros atuam como predadores ou parasitoides de pragas agrícolas, contribuindo para o controle biológico e a regulação de populações de artrópodes (Gilbert, 2005; Marshall, 2006). A coexistência de múltiplas estratégias tróficas dentro da ordem Diptera — incluindo herbivoria, detritivoria, predação, parasitismo e polinização — evidencia a grande versatilidade funcional desse grupo e sua importância nas redes ecológicas (Yeates & Wiegmann, 2005; Adler & Courtney, 2019).

Devido à sua diversidade ecológica, ciclos de vida relativamente curtos e sensibilidade às condições ambientais, as assembleias de dípteros frequentemente respondem rapidamente a mudanças ambientais. Muitas espécies apresentam associações estreitas com micro-habitats específicos, substratos ou condições ambientais particulares, como níveis de umidade, estrutura da vegetação e disponibilidade de matéria orgânica (Paoletti & Bressan, 1996; Pollet, 2010; Adler & Courtney, 2019). Consequentemente, mudanças na diversidade, abundância e composição funcional das comunidades de dípteros podem fornecer indicações precoces de distúrbios ambientais, mudanças no uso da terra e processos de recuperação ecológica (Majer, 2009; Pollet, 2010). Os estágios larvais são frequentemente particularmente sensíveis às condições ambientais, uma vez que

dependem de substratos específicos, como sedimentos aquáticos, matéria orgânica em decomposição ou serrapilheira florestal, o que os torna indicadores úteis da qualidade do habitat e da integridade dos ecossistemas (Paoletti & Bressan, 1996; Adler & Courtney, 2019).

Diversos estudos demonstraram que a diversidade e a composição das comunidades de dípteros variam de maneira previsível ao longo de gradientes de distúrbio ambiental, estrutura da paisagem e heterogeneidade ambiental. Alterações na cobertura florestal, fragmentação, complexidade da vegetação e intensidade do uso da terra podem influenciar a riqueza de espécies, a abundância e a diversidade funcional de dípteros em paisagens tropicais e temperadas (Didham et al., 1998; Gottschalk et al., 2007; Barnett et al., 2015). Em escalas espaciais mais amplas, análises de paisagem indicam que a riqueza de espécies e a diversidade funcional de dípteros tendem a estar positivamente associadas à cobertura florestal e à heterogeneidade ambiental, enquanto paisagens agrícolas simplificadas frequentemente apresentam redução na diversidade funcional e alterações na estrutura das comunidades (Barnett et al., 2015). Esses padrões destacam a sensibilidade das comunidades de dípteros a gradientes ambientais e reforçam seu potencial como indicadores de condição ecológica e mudanças na paisagem.

Avanços recentes na ecologia molecular ampliaram ainda mais o potencial de Diptera como ferramentas para monitoramento da biodiversidade. Técnicas de metabarcoding de DNA e DNA ambiental (eDNA) permitem atualmente a caracterização rápida de comunidades altamente diversas de invertebrados a partir de amostras ambientais ou amostras em massa, superando muitas das limitações taxonômicas associadas à identificação morfológica tradicional. Esses métodos têm demonstrado grande potencial para avaliações de biodiversidade em larga escala e monitoramento ecológico em diferentes ecossistemas (Taberlet et al., 2012; Deiner et al., 2017; van der Heyde et al., 2022). Além disso, os próprios dípteros podem atuar como amostradores de biodiversidade de vertebrados por meio da análise de DNA ingerido (iDNA). Estudos demonstraram que moscas necrófagas podem fornecer informações confiáveis sobre comunidades de mamíferos em florestas tropicais, contribuindo para levantamentos de biodiversidade e monitoramento de fauna (Calvignac-Spencer et al., 2013; Calvignac-Spencer et al., 2017). Essas abordagens

destacam a crescente importância dos dípteros em programas de monitoramento ecológico baseados em ferramentas moleculares.

Além de sua relevância ecológica, Diptera inclui alguns dos mais importantes vetores artrópodes de patógenos que afetam seres humanos, animais domésticos e fauna silvestre. Mosquitos (Culicidae), simulídeos (Simuliidae) e flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) transmitem uma ampla variedade de parasitas e vírus responsáveis por doenças como malária, dengue, zika, leishmaniose e oncocercose (Gubler, 2002; Marcondes & Day, 2019). Mudanças ambientais, incluindo desmatamento, expansão urbana e intensificação agrícola, podem influenciar fortemente a ecologia e a distribuição desses vetores ao modificar habitats de reprodução, disponibilidade de hospedeiros e condições microclimáticas que afetam a sobrevivência dos vetores e a dinâmica de transmissão de patógenos (Patz et al., 2004; Kilpatrick & Randolph, 2012). Diversos estudos também relacionam mudanças no uso da terra e perda de biodiversidade com a emergência ou reemergência de doenças infecciosas transmitidas por vetores (Jones et al., 2008; Allen et al., 2017).

Essas interações entre integridade dos ecossistemas, biodiversidade e emergência de doenças constituem a base conceitual da abordagem One Health, que enfatiza a interdependência entre saúde humana, saúde animal e saúde ambiental (Destoumieux-Garzón et al., 2018). Sob essa perspectiva, distúrbios ecológicos como fragmentação de habitats, perda de biodiversidade e mudanças climáticas podem alterar interações entre hospedeiros, vetores e patógenos, influenciando os riscos de transmissão de doenças (Patz et al., 2004; Jones et al., 2008; Destoumieux-Garzón et al., 2018). Considerando que os dípteros desempenham simultaneamente papéis ecológicos essenciais e incluem diversos vetores de importância médica, o monitoramento de suas comunidades oferece uma oportunidade valiosa para integrar avaliação da biodiversidade e vigilância epidemiológica.

Em paisagens em restauração ecológica, o monitoramento da biodiversidade de dípteros pode fornecer informações importantes tanto sobre a recuperação dos ecossistemas quanto sobre possíveis mudanças na ecologia de vetores. Alterações nas assembleias de moscas podem refletir melhorias na estrutura do habitat, nos processos de ciclagem de nutrientes e nas interações tróficas, ao mesmo tempo em que indicam mudanças nas condições ambientais que podem influenciar a dinâmica

de transmissão de patógenos. Quando combinado com abordagens moleculares modernas, como o metabarcoding de DNA, o monitoramento baseado em dípteros pode fornecer informações de alta resolução sobre padrões de biodiversidade e trajetórias de recuperação ecológica ao longo de gradientes de restauração. Dessa forma, a integração da análise de comunidades de Diptera em programas de monitoramento ecológico representa uma abordagem promissora para conectar restauração de ecossistemas, conservação da biodiversidade e saúde pública dentro de uma perspectiva integrada de One Health.

2.6 A importância ecológica e epidemiológica dos flebotomíneos

Dentro de Diptera, os flebotomíneos representam um grupo taxonômico crucial que vincula padrões de biodiversidade e dinâmicas de transmissão de doenças. Distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais, os flebotomíneos ocupam diversos habitats, desde florestas primárias até ambientes peridomiciliares, onde transmitem protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, os agentes etiológicos das leishmanioses (Aguilar et al., 1998; Ready, 2013; Bezerra-Santos et al., 2023).

A estrutura e a integridade dos habitats, particularmente ao longo de gradientes que vão de florestas densas a áreas antropogênicas (ex: pastagens, periferias urbanas, mosaicos agrícolas), influenciam fortemente a abundância, a diversidade e as taxas de infecção dos flebotomíneos (Martínez et al., 2019; Aguilar et al., 1998). Em geral, ambientes florestais preservados abrigam assembleias de flebotomíneos mais diversas e especializadas, enquanto paisagens perturbadas favorecem algumas espécies generalistas capazes de explorar condições alteradas (Guerra et al., 2006; Ferreira et al., 2019; Londoño et al., 2024). Essa plasticidade ecológica sustenta a expansão epidemiológica da leishmaniose, à medida que espécies vetoras, como o *Lutzomyia longipalpis*, se adaptam a habitats modificados pelo homem (Luz et al., 2001; dos Santos et al., 2022).

2.7 Gradientes ecológicos e padrões de diversidade

As populações de flebotomíneos exibem respostas consistentes ao distúrbio e à restauração do habitat. Em Manaus (Amazonas, Brasil), um fragmento de floresta urbana sustentou 41 espécies de *Lutzomyia* e um índice de diversidade alfa de

aproximadamente 6,4 — comparável ao de florestas amazônicas contínuas — enquanto zonas urbanas próximas foram dominadas por poucos táxons (da Rocha et al., 2013). No Maranhão, a riqueza de espécies foi marcadamente superior em habitats florestais (38 espécies) do que em locais peridomiciliares ou intradomiciliares, com diferenças significativas na estrutura de dominância (Rebêlo et al., 2010). Da mesma forma, em João Pessoa (Paraíba), fragmentos florestais mantiveram uma variedade de espécies não vetoras, enquanto ambientes urbanizados foram esmagadoramente dominados por *L. longipalpis* (dos Santos et al., 2022).

Sob a perspectiva da diversidade beta, as assembleias em ambientes antropogênicos não são meramente subconjuntos empobrecidos das comunidades florestais, mas constituem assembleias distintas estruturadas por forte filtragem ambiental e modificação de habitat (Guimarães et al., 2019). Padrões de diversidade alfa mostram consistentemente uma separação clara entre amostras de peridomicílio e de floresta, refletindo uma reorganização da composição da comunidade em direção a táxons oportunistas e tolerantes a distúrbios em ambientes modificados pelo homem (McKinney, 2006; Didham et al., 1998). À medida que as intervenções de restauração recuperam progressivamente a estrutura da floresta — particularmente a cobertura do dossel e o aporte de matéria orgânica — espera-se que a composição da comunidade mude para assembleias dominadas por táxons associados à floresta. Nesse contexto, os flebotomíneos mostram-se promissores como bioindicadores da recuperação do ecossistema, já que a estrutura de suas assembleias acompanha de perto os gradientes de integridade e distúrbio do habitat (Ramos et al., 2014; Costa et al., 2019).

2.8 Desafios da identificação morfológica e a ascensão das ferramentas moleculares

Apesar de sua importância ecológica e epidemiológica, a identificação de flebotomíneos permanece tecnicamente desafiadora. Seu tamanho corporal reduzido (2–4 mm), uniformidade morfológica e caracteres diagnósticos frágeis (ex: cibário, faringe, terminália) complicam a identificação em nível de espécie, particularmente em grandes amostras de armadilhas onde milhares de espécimes podem ser coletados (Depaquit, 2014; Depaquit et al., 1998;Martins et al., 1978). Por exemplo, levantamentos individuais renderam de 1.400 a 7.500 espécimes por local, exigindo

um tempo extensivo de processamento e montagem em lâminas (Guerra et al., 2006; Ferreira et al., 2019).

A crypticidade morfológica agrava ainda mais a questão: diversas espécies de *Lutzomyia* são morfologicamente indistinguíveis, mas genética e epidemiologicamente distintas (Depaquit, 2014). Essa limitação dificulta a avaliação precisa da biodiversidade e a vigilância de vetores, especialmente em estudos ecológicos ou de restauração em larga escala.

Consequentemente, a taxonomia integrativa — combinando dados morfológicos, moleculares e ecológicos — tornou-se essencial. O *DNA barcoding* (tipicamente *cox1*), o *metabarcoding* de amostras de insetos em massa, o sequenciamento de genes mitocondriais (*cytB*), o PCR multiplex e a espectrometria de massas MALDI-TOF são agora amplamente utilizados para complementar a identificação clássica (Cywinska et al., 2006; Kumar et al., 2007; Elbrecht & Leese, 2015; Porter & Hajibabaei, 2018). Esses métodos fornecem identificação rápida, escalável e reprodutível, aprimorando os conjuntos de dados ecológicos e epidemiológicos. Na vigilância de mosquitos, o *metabarcoding* reduziu o tempo de identificação de dias para horas, e abordagens semelhantes estão surgindo agora para os flebotomíneos (Elbrecht & Leese, 2015; Creedy et al., 2019).

2.9. Métodos baseados em DNA para restauração e vigilância epidemiológica

Além da taxonomia, as ferramentas baseadas em DNA têm o potencial de monitorar simultaneamente a recuperação da biodiversidade e a dinâmica de patógenos. O DNA ambiental e o DNA derivado de invertebrados (eDNA/iDNA) podem gerar métricas de biodiversidade padronizadas aplicáveis a programas de restauração, enquanto a triagem de patógenos no DNA do vetor fornece alertas precoces de mudanças no risco de doenças (Liddicoat et al., 2022; Hernández-Triana et al., 2021; Kocher et al., 2023).

Para o monitoramento da restauração, o *metabarcoding* de assembleias de invertebrados oferece indicadores sensíveis e de alto rendimento da recuperação da comunidade e da complexidade funcional (van der Heyde et al., 2022; Allen et al.,

2024). O iDNA de insetos hematófagos, incluindo flebotomíneos, pode detectar a presença de hospedeiros vertebrados em um ecossistema, servindo assim como um *proxy* para a restauração da rede trófica (Schnell et al., 2012; Clare et al., 2019). Por sua vez, a vigilância epidemiológica molecular utiliza os mesmos extratos de DNA para detectar *Leishmania* spp. ou outros patógenos em populações de vetores, unindo os objetivos de conservação e vigilância de doenças sob um arcabouço metodológico compartilhado (Posada-López et al., 2023).

Essa visão integrativa alinha-se ao paradigma de **Saúde Única**, que enfatiza que a saúde humana, a saúde da vida selvagem e a saúde dos ecossistemas são interdependentes (Destoumieux-Garzón et al., 2018; Allen et al., 2017). Ao adotar ferramentas baseadas em DNA capazes de atender tanto à ecologia da restauração quanto à vigilância epidemiológica, pesquisadores e formuladores de políticas podem desenvolver sistemas de alerta precoce que protejam a biodiversidade e reduzam os riscos à saúde pública em paisagens em transformação.

2.10 Integrando a restauração ecológica e a vigilância epidemiológica

A crescente interseção entre a ciência da biodiversidade e a saúde pública destaca uma oportunidade crítica: o desenvolvimento de sistemas de monitoramento integrativos que avaliem simultaneamente a recuperação dos ecossistemas e o risco de doenças. À medida que as mudanças no uso da terra, o desmatamento e a variabilidade climática aceleram a perda de biodiversidade, eles também alteram a ecologia dos vetores e reservatórios de doenças (Allen et al., 2017; Bezerra-Santos et al., 2023). Este desafio duplo — restaurar a integridade ecológica enquanto se mitigam os riscos à saúde — exige metodologias interdisciplinares capazes de quantificar tanto as dimensões ecológicas quanto as epidemiológicas das mudanças ambientais.

As estruturas tradicionais de monitoramento têm tratado esses domínios de forma separada. A ecologia da restauração tem se concentrado em métricas como cobertura vegetal, riqueza de espécies e diversidade funcional (Ruiz-Jaen & Aide, 2005; Gann et al., 2019), enquanto a epidemiologia tem se baseado em levantamentos entomológicos, diagnósticos de patógenos e notificações de casos (OMS, 2020). No entanto, ambos dependem fundamentalmente dos mesmos processos ecológicos —

estrutura do habitat, interações entre espécies e composição da comunidade — que determinam se as paisagens sustentam a biodiversidade ou facilitam a transmissão de patógenos (Keesing et al., 2010; Rohr et al., 2020).

A integração desses domínios sob um arcabouço metodológico compartilhado pode gerar benefícios sinérgicos. Por exemplo, a recuperação da diversidade faunística e microbiana em áreas restauradas pode reestabelecer redes ecológicas que amortecem a amplificação de patógenos, enquantoz a detecção molecular de DNA de vetores ou patógenos pode fornecer alertas precoces de desequilíbrio ecológico (Kocher et al., 2023; Hernández-Triana et al., 2021). O monitoramento baseado em DNA atua, portanto, como um barômetro da biodiversidade e um sistema sentinela para a saúde pública, unindo as metas das agendas de Saúde Única e de Restauração de Ecossistemas (Destoumieux-Garzón et al., 2018; PNUMA, 2020).

2.11 Métodos baseados em DNA como uma solução integrativa

O *metabarcoding* de DNA ambiental e de DNA derivado de invertebrados (eDNA/iDNA) representa uma das inovações mais promissoras para essa integração. Essas abordagens podem caracterizar comunidades complexas de invertebrados, vertebrados e patógenos a partir de um único fluxo de trabalho de amostragem (Taberlet et al., 2012; Andújar et al., 2018; Creedy et al., 2019). Em contextos de restauração, o eDNA fornece métricas de biodiversidade escaláveis que acompanham trajetórias ecológicas ao longo do tempo, complementando as avaliações de campo tradicionais (Liddicoat et al., 2022; van der Heyde et al., 2022). Em paralelo, a vigilância epidemiológica molecular utiliza os mesmos dados de DNA para detectar espécies vetoras e sequências de patógenos, fortalecendo as redes de vigilância de doenças (Kocher et al., 2023; Posada-López et al., 2023).

A convergência desses métodos permite um monitoramento de duplo propósito, no qual a restauração da biodiversidade e a vigilância de vetores informam uma à outra. Por exemplo, o *metabarcoding* de amostras de insetos em massa de florestas restauradas poderia revelar simultaneamente (i) a recuperação taxonômica das comunidades de invertebrados, (ii) a detecção de DNA de vertebrados via iDNA e (iii) a presença de DNA de patógenos. Esse conjunto de dados unificado permite interpretações integradas — identificando se a recuperação do ecossistema se

correlaciona com a redução da detecção de patógenos ou com a alteração na composição dos vetores. Além da eficiência metodológica, essa integração personifica uma mudança conceitual em direção à prevenção de doenças baseada no ecossistema.

2.12 Diptera como modelo para monitoramento molecular integrativo

Dentro desse framework, a ordem Diptera — e particularmente os flebotomíneos — representam um grupo modelo para o desenvolvimento e teste de ferramentas de monitoramento baseadas em DNA. Suas características de história de vida, sensibilidade ecológica e capacidade vetorial os tornam organismos ideais para estudar a interface entre a recuperação do ecossistema e o risco de doenças (Bezerra-Santos et al., 2023; Martínez et al., 2019). As assembleias de flebotomíneos respondem de forma mensurável a gradientes de cobertura vegetal, umidade e matéria orgânica — fatores diretamente influenciados por ações de restauração (Alexander et al., 2001; Galati et al., 2010; Ferreira et al., 2019). Consequentemente, mudanças na estrutura da comunidade de flebotomíneos podem servir como bioindicadores do sucesso da restauração, enquanto a triagem molecular simultânea para DNA de *Leishmania* oferece *insights* sobre a dinâmica de doenças transmitidas por vetores.

Essa dualidade exemplifica o contínuo da Saúde Única: a conservação da biodiversidade, a restauração de ecossistemas e a saúde humana não são objetivos separados, mas resultados interdependentes dos mesmos processos ecológicos.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar das crescentes evidências sobre o potencial das abordagens baseadas em DNA, lacunas fundamentais permanecem:

- Sub-representação de insetos vetores tropicais**:** Embora os métodos de eDNA sejam cada vez mais aplicados em ecossistemas temperados, sua validação para dípteros tropicais, particularmente flebotomíneos, ainda é incipiente.

- Necessidade de protocolos moleculares padronizados**:** A variação na seleção de marcadores, *pipelines* de bioinformática e bancos de dados de referência limita a comparabilidade entre estudos.
- Escassez de frameworks de duplo propósito**:** Poucos estudos avaliam dados moleculares simultaneamente como indicadores de restauração e ferramentas de vigilância de doenças.

4. OBJETIVOS

Esta dissertação tem como objetivo principal avaliar o potencial do metabarcoding de DNA associado a tecnologias de amostragem de baixo custo para o monitoramento da restauração ecológica e da composição de assembleias de Diptera, com ênfase na família Psychodidae, ao longo de um gradiente de antropização. O estudo busca caracterizar a diversidade e a estrutura dessas comunidades em áreas de floresta protegida, restauração e influência antrópica; avaliar o efeito de diferentes resoluções moleculares (OTUs e ZOTUs) sobre as métricas ecológicas; investigar a associação de linhagens de Psychodidae com diferentes contextos ambientais; avaliar, por meio de análise in silico, a especificidade dos iniciadores utilizados; e realizar um teste piloto de uma armadilha luminosa não comercial de baixo custo. Adicionalmente, a partir de uma reanálise de dados independentes, busca-se avaliar o potencial de Diptera como grupo bioindicador.

5. CONTRIBUIÇÕES ESPERADAS

Ao unir a ecologia da restauração, o monitoramento molecular e a ecologia de insetos (com ênfase em potenciais vetores), esta pesquisa contribui conceitual e metodologicamente para o avanço do monitoramento ambiental integrado baseado em DNA. Espera-se que este trabalho possa:

- Fornecer protocolos metodológicos para a amostragem e identificação de dípteros em contextos de restauração, demonstrando a viabilidade técnica do uso de armadilhas luminosas de baixo custo;
- Oferecer evidências empíricas sobre como o nível de conservação e a recuperação do habitat influenciam a estrutura, a diversidade e a distribuição das assembleias de flebotomíneos;

- Fortalecer a ponte conceitual entre a avaliação da resiliência dos ecossistemas e a vigilância entomológica preventiva; e
- Informar autoridades de conservação e saúde pública sobre estratégias acessíveis e escaláveis para o monitoramento ecológico e epidemiológico simultâneo.

Em última análise, este trabalho alinha-se a agendas globais, como a Década das Nações Unidas da Restauração de Ecossistemas e o Painel de Especialistas de Alto Nível em Saúde Única (OHHLEP), ao demonstrar como as ferramentas moleculares e abordagens de amostragem acessíveis podem operacionalizar a interface entre a conservação da biodiversidade e a prevenção em saúde — uma prioridade cada vez mais urgente em um mundo em rápida transformação.

6. MÉTODOS

6.1. Área de estudo

A região do Pontal do Paranapanema, localizada no oeste do estado de São Paulo, Brasil, passou por um processo de desmatamento extensivo durante meados do século XX, impulsionado pela colonização de terras liderada pelo estado, apropriação ilegal de terras e a rápida expansão da pecuária e da agricultura comercial. Esses processos resultaram na remoção quase completa da cobertura original de Mata Atlântica, restando apenas remanescentes isolados, sendo o Parque Estadual Morro do Diabo o vestígio mais notável da paisagem original (Leite & Cortez, 2013; Feliciano, 2019). Embora grandes reservas florestais tenham sido legalmente estabelecidas na década de 1940, a fiscalização precária e a grilagem sistemática de terras levaram ao seu desmantelamento progressivo, transformando o que antes era um dos maiores blocos de floresta contínua do interior do sudeste brasileiro em uma fronteira agrícola altamente fragmentada (Dean, 1996; Victor et al., 2005).

A partir da década de 1980, a região tornou-se emblemática pelos conflitos agrários no Brasil, marcados por persistentes disputas de posse de terra envolvendo latifundiários, assentamentos de reforma agrária e movimentos sociais. Esses conflitos remodelaram as dinâmicas de uso do solo e produziram um mosaico socioecológico heterogêneo, no qual coexistem, em estreita proximidade,

remanescentes florestais, áreas restauradas, assentamentos de pequenos produtores, fazendas de pecuária extensiva e plantações de cana-de-açúcar (Feliciano, 2019; Fernandes et al., 2012).

Apesar desse histórico de degradação, o Pontal do Paranapanema emergiu como uma paisagem focal para pesquisas ecológicas e iniciativas de restauração em larga escala. Estudos de longo prazo realizados em fragmentos florestais e áreas protegidas — particularmente dentro e ao redor do Parque Estadual Morro do Diabo — forneceram *insights* fundamentais sobre a persistência da biodiversidade, efeitos de borda e conectividade da paisagem em sistemas fragmentados de Mata Atlântica (Cullen Jr. et al., 2000; Metzger, 2000). Desde o início dos anos 2000, iniciativas de restauração lideradas por organizações não governamentais, especialmente o Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ), adotaram uma abordagem em escala de paisagem focada no reflorestamento e no estabelecimento de corredores ecológicos. Esses esforços integram cada vez mais mecanismos de crédito de carbono sob mercados voluntários, vinculando a restauração florestal à mitigação climática, conservação da biodiversidade e apoio aos meios de subsistência locais (Rodrigues et al., 2009; Cullen Jr. et al., 2013; Chazdon et al., 2017; IPÊ, 2021).

6.2. Amostragem e preservação de insetos

Insetos voadores foram coletados utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, instaladas ao entardecer e operadas continuamente durante toda a noite em 15 pontos amostrais representativos da paisagem. Estes pontos foram distribuídos proporcionalmente entre os três contextos ambientais avaliados: floresta protegida (Parque; n = 3), áreas de influência urbana (Assentamentos Humanos; n = 5) e áreas em processo de recuperação ecológica (Restauração; n = 7). A amostragem foi realizada na região do Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil, durante o período de 25 de novembro a 01 de dezembro de 2024. Os espécimes capturados foram preservados em etanol absoluto (95–100%) imediatamente após a coleta e armazenados a −20 °C até o processamento laboratorial para extração de DNA e sequenciamento.

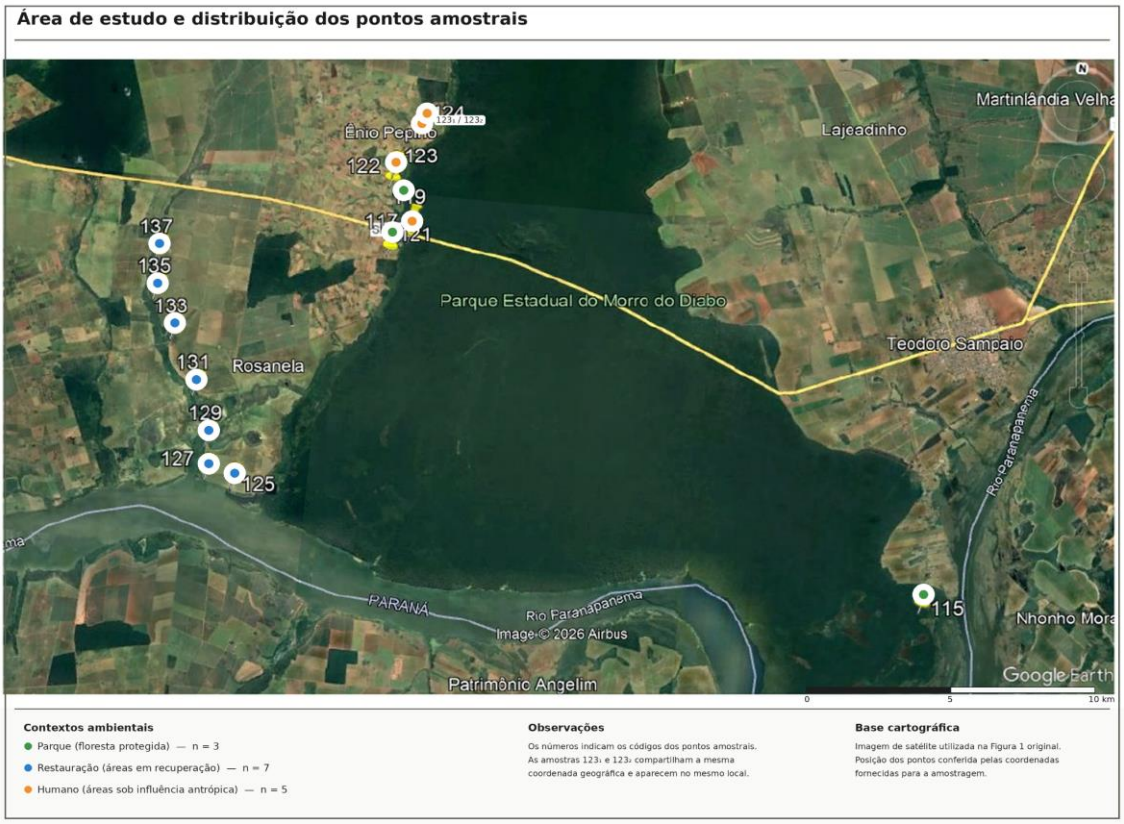
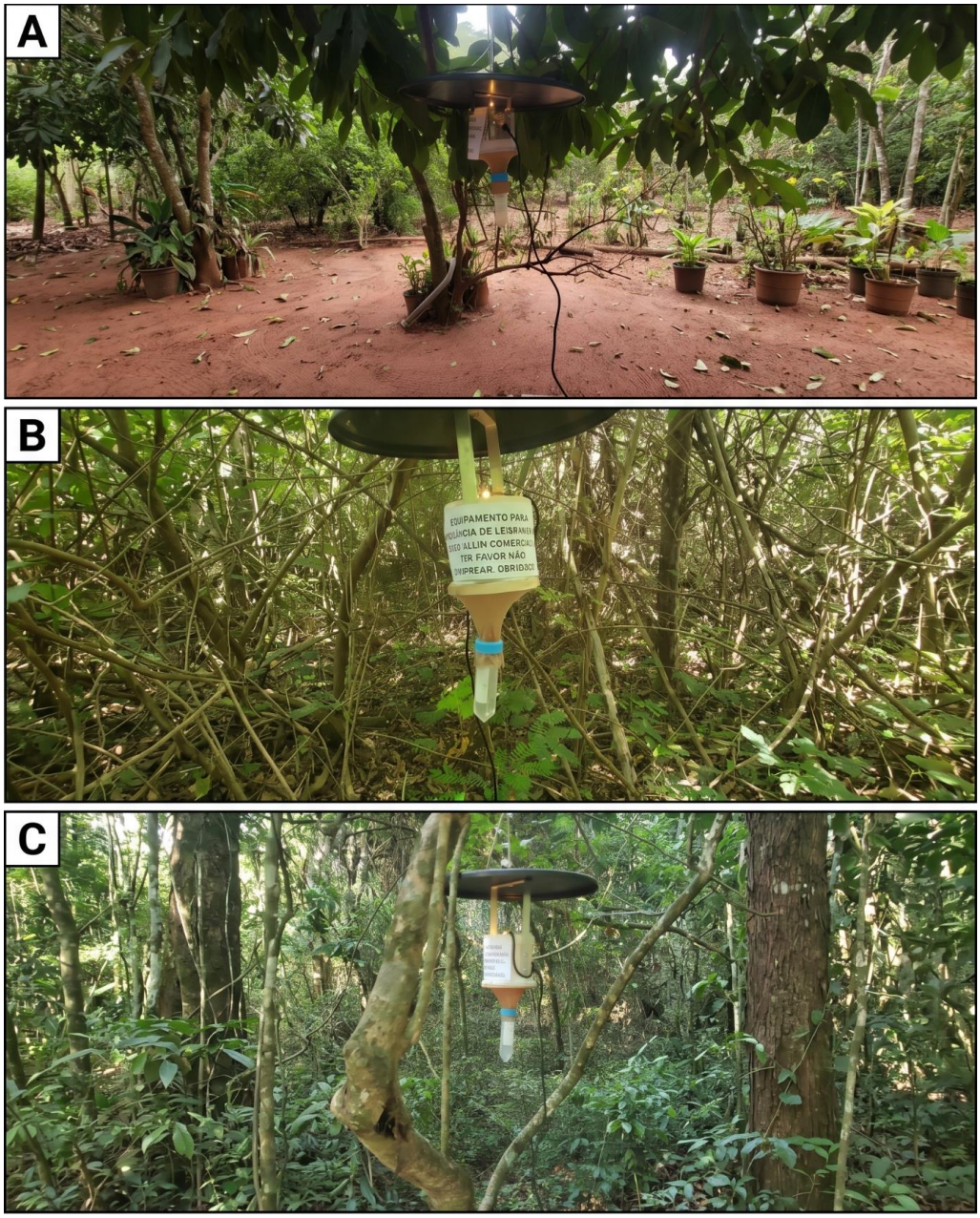


Figura 1. Localização da área de estudo e distribuição dos pontos amostrais no Pontal do Paranapanema, São Paulo, Brasil. Os pontos indicam os locais de instalação das armadilhas luminosas CDC nos três contextos ambientais avaliados: Parque (floresta protegida; n = 3), Restauração (n = 7) e Humano (áreas sob influência antrópica; n = 5). Os números correspondem aos códigos dos pontos amostrais; 123_1 e 123_2 representam duas amostras associadas à mesma coordenada geográfica.



.**Figura 2. I**nstalação de armadilhas CDC: A (Área humana)**:** Ambiente peridomiciliar (quintal), representando o local de maior risco de contato entre os vetores e a população; B (Restauração)**:** Área de vegetação secundária em processo de regeneração natural. C (Parque)**:** Ambiente de floresta nativa conservada, representando o habitat silvestre original.

6.3. Extração de DNA e PCR

Os espécimes coletados nas armadilhas luminosas CDC foram processados por meio de metabarcoding de amostras em massa (*bulk samples*), sem a separação individual

dos organismos antes da extração. Dessa forma, as amostras incluíram os flebotomíneos e os demais artrópodes capturados simultaneamente nas armadilhas. Essa abordagem permite a caracterização molecular da assembleia de organismos coletados, reduzindo a necessidade de triagem e identificação morfológica individual.

A extração de DNA foi realizada por meio de maceração mecânica do material biológico, seguida de precipitação salina (*salting out*), conforme protocolo modificado de Pedro et al. (2021). Inicialmente, o material das amostras foi homogeneizado mecanicamente na presença de esferas de zircônia de diferentes granulometrias. Uma alíquota do material homogeneizado foi transferida para tubos de lise contendo esferas de menor granulometria, adicionando-se água destilada para favorecer a ruptura dos tecidos e a liberação do material genético.

Após a maceração, a suspensão obtida foi submetida à precipitação salina mediante adição de solução de cloreto de sódio (NaCl), seguida de homogeneização e centrifugação. O sobrenadante, contendo o DNA em solução, foi transferido para um novo tubo e submetido à precipitação com etanol absoluto, sob resfriamento. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA submetido a lavagens sucessivas com etanol a 70%, visando à remoção de sais e outras impurezas residuais. O precipitado foi posteriormente seco e ressuspendido em solução tampão TE (*Tris-EDTA*), constituindo o estoque de DNA utilizado nas etapas subsequentes de amplificação.

Controles negativos de extração foram processados simultaneamente às amostras, utilizando os mesmos reagentes e etapas do procedimento, porém sem a adição de material biológico. Esses controles foram mantidos nas etapas posteriores de amplificação para monitorar possíveis contaminações introduzidas durante o processamento laboratorial.

A amplificação das regiões-alvo foi realizada por meio de uma estratégia de PCR em duas etapas (*two-step PCR*), empregada na construção das bibliotecas para sequenciamento de metabarcoding. Na primeira reação (PCR1), foram utilizados iniciadores específicos para a família Psychodidae, direcionados à amplificação do marcador molecular selecionado para o estudo: Psychodidae-F (5′-AGAGTTAAANAGTACGTGAAACCGTA-3′) e Psychodidae-R (5′-

CGGGYCYCGAAGGTATCT-3′). Os iniciadores foram sintetizados contendo sequências adicionais (*overhangs*) compatíveis com a tecnologia de sequenciamento Illumina, permitindo a posterior incorporação dos adaptadores e índices de identificação das amostras.

Na segunda etapa (PCR2), foram incorporados os índices de identificação (*indexing primers*) e as sequências adaptadoras necessárias à construção das bibliotecas de sequenciamento. Esse procedimento permitiu a identificação individual das amostras após o sequenciamento multiplexado. Os produtos amplificados foram submetidos à purificação e quantificação, sendo posteriormente preparados para o sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq, utilizando configuração de leitura pareada (*paired-end*).

6.3.1. Validação in silico da especificidade dos primers

A conservação das regiões de anelamento dos primers Psychodidae-F e Psychodidae-R foi avaliada por meio de análises de Sequence Logo, utilizando sequências de referência disponíveis em arquivos FASTA. As sequências foram organizadas em quatro grupos taxonômicos mutuamente exclusivos: (i) Psychodidae, definido como grupo-alvo; (ii) Nematocera, excluindo Psychodidae; (iii) Diptera, excluindo Nematocera; e (iv) Arthropoda/Insecta, excluindo Diptera. A classificação foi realizada com base nas informações taxonômicas presentes nos cabeçalhos dos arquivos FASTA.

Para cada primer, foram construídos gráficos de Sequence Logo a partir das frequências relativas dos nucleotídeos em cada posição das regiões correspondentes aos sítios de anelamento. As matrizes de frequência foram utilizadas para representar a conservação nucleotídica por meio do conteúdo de informação, expresso em bits, utilizando o pacote `seqLogo` no ambiente R.

As sequências originais dos primers foram apresentadas abaixo dos respectivos gráficos, permitindo a comparação visual entre a composição nucleotídica de referência e a variação observada nos diferentes grupos taxonômicos. Os códigos de bases degeneradas foram interpretados conforme a nomenclatura IUPAC.

A análise foi realizada separadamente para os primers forward e reverse, permitindo avaliar a conservação de cada região de anelamento no grupo-alvo e nos grupos taxonômicos não alvo. A abordagem gráfica seguiu o princípio utilizado por Pedro et al. (2023) na avaliação da complementaridade dos primers desenvolvidos para Collembola.

6.4 Bioinformática e análise de dados

As leituras (reads) brutas foram inicialmente processadas por meio da montagem dos pares, filtragem de qualidade, remoção de quimeras e redução de ruído (denoising) para geração de ZOTUs (Zero-radius Operational Taxonomic Units) utilizando o algoritmo UNOISE3 no USEARCH (Edgar, 2016; Callahan et al., 2016). Após esta etapa primária de exploração e definição das ZOTUs, o fluxo de trabalho analítico prosseguiu no software Mothur (Schloss et al., 2009) para as etapas subsequentes. A atribuição taxonômica foi realizada utilizando o classificador RDP com uma base de referência otimizada para a família Psychodidae.

Para as análises ecológicas, foi construída uma matriz de abundância ao nível de ZOTU. A diversidade alfa foi avaliada utilizando o índice de diversidade de Shannon, e as diferenças entre os tipos de habitat foram analisadas após a verificação das premissas dos modelos; quando a normalidade e a homocedasticidade foram atendidas, aplicou-se a análise de variância (ANOVA), enquanto o teste não paramétrico de Kruskal–Wallis foi utilizado quando as premissas foram violadas.

A diversidade beta foi examinada por meio da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA; adonis2) baseada em matrizes de dissimilaridade de Bray–Curtis. Antes da PERMANOVA, a homogeneidade da dispersão multivariada foi avaliada pelo procedimento betadisper para garantir que as diferenças observadas não fossem causadas por variabilidade desigual dentro dos grupos. Os padrões de composição da comunidade foram visualizados por meio de ordenação por escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) (Legendre & Legendre, 2012; Oksanen et al., 2022).

Para garantir a robustez das inferências ecológicas e mitigar potenciais vieses associados ao agrupamento de sequências, a estrutura das comunidades foi avaliada em duas resoluções taxonómicas: Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs)

agrupadas a 97% de similaridade, servindo como um proxy consolidado para a delimitação ao nível de espécie, e Variantes de Sequência Exatas (ZOTUs/ASVs) a 100% de resolução. A comparação entre estas duas abordagens permite distinguir o impacto do filtro ambiental sobre a diversidade ao nível da espécie biológica e da microdiversidade intraespecífica (Callahan et al., 2017).

6.5. Validação de Bioindicadores por Reanálise de Dados Secundários

Para fundamentar a eleição da ordem Diptera como táxon focal para o biomonitoramento da restauração ecológica e vigilância epidemiológica, foi realizada uma reanálise independente de dados secundários de metabarcoding. Utilizou-se o conjunto de dados públicos gerado por Souto-Vilarós et al. (2024), que amostrou comunidades de artrópodes em massa utilizando armadilhas luminosas na Ilha de Barro Colorado (Panamá) durante as estações seca e chuvosa. A matriz de abundância de Barcode Index Numbers (BINs) foi filtrada para isolar as ordens Diptera e Lepidoptera. A sensibilidade ecológica de cada ordem frente à mudança sazonal foi quantificada por meio de Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) baseada em distâncias de Bray-Curtis, utilizando 999 permutações. A ordenação das comunidades foi visualizada por meio de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS).

6.6. Perspectivas Metodológicas: Teste Piloto com Armadilhas CDC de Baixo Custo

Durante a execução deste estudo, o esforço amostral (n) foi diretamente limitado pela disponibilidade restrita e pelo elevado custo de aquisição das armadilhas luminosas comerciais padrão. Reconhecendo que essa restrição logística representa um gargalo significativo para a escalabilidade de futuros programas de monitoramento em larga escala, foi desenvolvido e testado um protótipo alternativo de armadilha CDC não comercial (Figura 3).

O principal objetivo deste teste foi propor uma solução metodológica economicamente viável para futuros experimentos. Enquanto uma armadilha comercial custa

aproximadamente R$ 600,00 (além de cerca de R$ 80,00 para a bateria de 12V), o protótipo não comercial foi construído com componentes acessíveis: um tubo de material reciclável (R$ 0,50), um microventilador de computador de 12V (R$ 25,00), um LED (R$ 2,00 a R$ 3,00), um prato de plástico atuando como cobertura (R$ 2,00 a R$ 3,00) e uma estrutura afunilada de coleta construída com arame e revestida com tecido tipo "meia" (custo estimado em R$ 5,00). Esta malha flexível forma o compartimento para onde os mosquitos caem e ficam retidos após serem atraídos pela luz e sugados pelo ventilador. Utilizando a mesma bateria (R$ 80,00), o custo total do equipamento alternativo girou em torno de R$ 115,00, representando uma redução superior a 80% no orçamento por armadilha.

Para avaliar a viabilidade dessa alternativa para estudos futuros, realizou-se um ensaio comparativo em campo utilizando 18 armadilhas: 9 comerciais e 9 não comerciais, instaladas simultaneamente. A métrica de avaliação consistiu em uma inspeção visual pareada do volume e da quantidade de insetos atraídos e capturados por ambos os modelos.



Figura 3. Protótipo de armadilha luminosa de sucção de baixo custo construída para o teste piloto, instalada em ambiente de coleta. A estrutura é composta por componentes acessíveis, indicados a seguir: (A) Cobertura protetora feita com prato de plástico; (B) Fios para sustentação da estrutura; (C) Fonte luminosa (LED azul); (D) Microventilador de 12V responsável pela sucção; (E) Corpo do funil estruturado com arame e revestido por tecido de malha fina (tipo "meia") para retenção dos insetos; (F) Tubo coletor (tipo Falcon) na extremidade inferior.

7. RESULTADOS

7.1. Especificidade de anelamento e fidelidade taxonômica *in silico*

A análise dos Sequence Logos evidenciou elevada conservação das regiões de anelamento dos primers Psychodidae-F e Psychodidae-R nas sequências pertencentes à família Psychodidae. Em ambos os primers, observou-se predominância das bases nucleotídicas correspondentes às sequências de referência, indicando elevada conservação das posições analisadas no grupo-alvo.

Em contraste, os grupos taxonômicos não alvo apresentaram maior variação nucleotídica nas regiões correspondentes aos sítios dos primers. Essa variação foi observada tanto em Nematocera não pertencentes a Psychodidae quanto nos demais Diptera e em Arthropoda/Insecta não pertencentes a Diptera, embora com diferentes padrões de conservação entre os grupos e entre os dois primers.

A comparação entre os primers revelou diferenças nos padrões de conservação dos grupos não alvo. Enquanto o Psychodidae-F apresentou maior variação em Diptera não pertencentes a Nematocera, o Psychodidae-R manteve maior conservação nesse grupo. Em Arthropoda/Insecta não pertencentes a Diptera, por sua vez, observou-se maior variação na região correspondente ao primer reverse.

De maneira geral, os resultados indicaram maior conservação dos sítios de anelamento em Psychodidae em comparação aos grupos não alvo, evidenciando maior complementaridade potencial dos primers com o grupo de interesse.

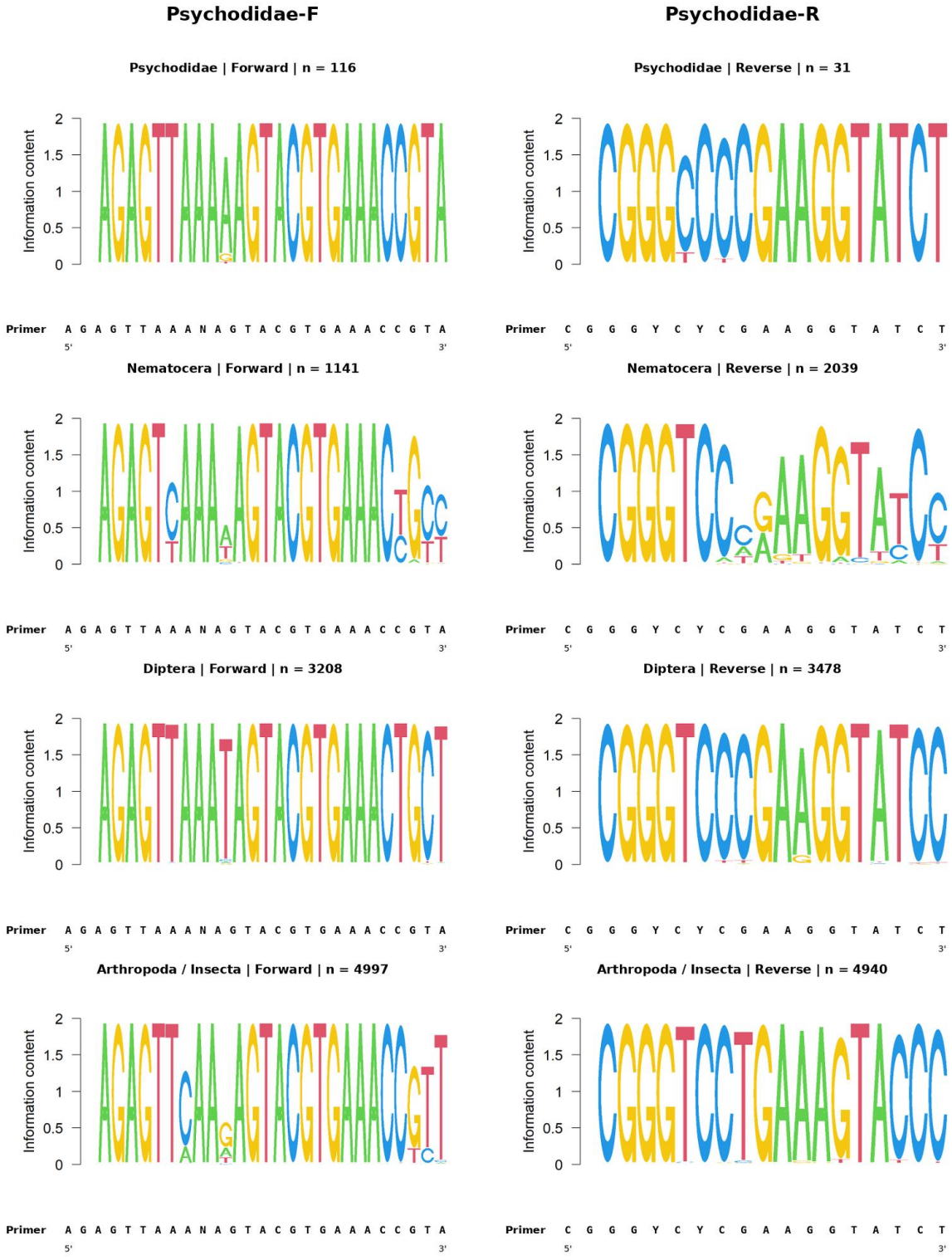


Figura 4. Sequence Logos das regiões correspondentes aos sítios de anelamento dos primers Psychodidae-F e Psychodidae-R em diferentes grupos taxonômicos. A coluna esquerda representa o primer forward e a coluna direita o primer reverse. As

linhas apresentam, respectivamente, Psychodidae, Nematocera não pertencentes a Psychodidae, Diptera não pertencentes a Nematocera e Arthropoda/Insecta não pertencentes a Diptera. A altura das letras representa o conteúdo de informação de cada nucleotídeo, expresso em bits, refletindo sua frequência e conservação em cada posição. As sequências originais dos primers são apresentadas abaixo dos respectivos gráficos para comparação.

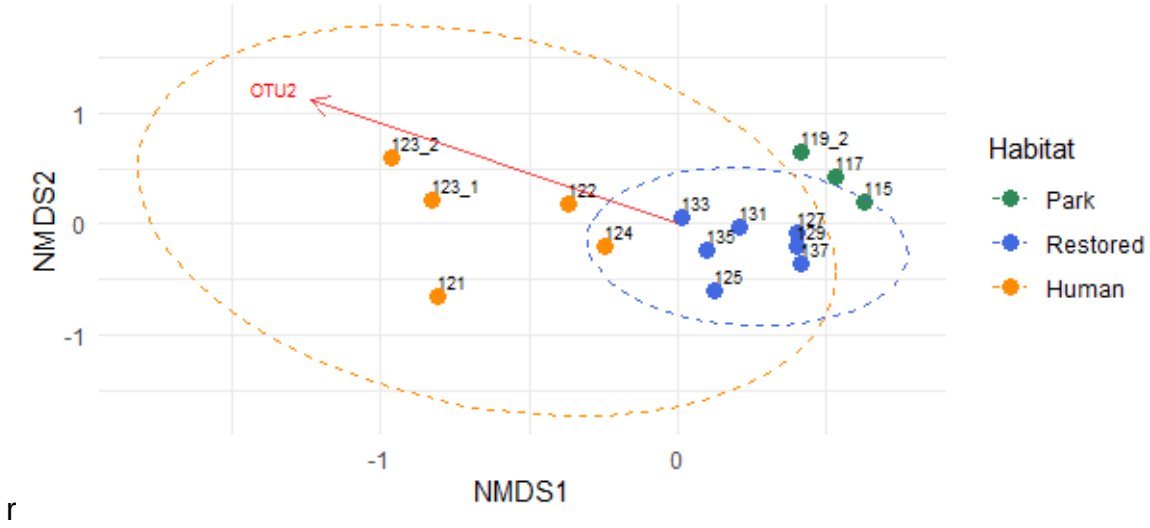
7.2. Estruturação ecológica da composição de OTU e ZOTUs (NMDS e PERMANOVA)

A avaliação da diversidade beta evidenciou uma profunda reestruturação espacial das comunidades de *Psychodidae* ao longo do gradiente de antropização. A análise de ordenação NMDS demonstrou uma segregação nítida das assembleias, onde a categoria "Restaurado" ocupou uma posição espacial intermediária entre o "Parque" e o habitat "Humano". Esse padrão é ecologicamente significativo, pois reflete a trajetória esperada de uma restauração em progresso: o distanciamento da assinatura biótica de áreas degradadas e a aproximação gradual em direção à estrutura da floresta de referência.

Esse padrão composicional manteve-se altamente consistente em ambas as resoluções bioinformáticas adotadas (**Figuras 5 e 6**). A dissimilaridade foi confirmada pela análise PERMANOVA global, que atestou o efeito determinante do habitat na composição das assembleias tanto no agrupamento a 97% (OTUs; $F = 2,394$; $R^2 = 0,285$; $p = 0,003$) quanto na resolução máxima a 100% (ZOTUs; $F = 2,536$; $R^2 = 0,297$; $p = 0,002$). O *turnover* biótico observado corrobora a transição ambiental entre o ambiente florestal preservado e a matriz urbana, situando as áreas em recuperação como um elo sucessional entre esses extremos.

Para detalhar essas distinções, realizaram-se comparações par-a-par (*pairwise*), utilizando o ajuste rigoroso de Bonferroni. A 100%, as áreas Restauradas apresentaram uma composição significativamente distinta das áreas Humanas (p-adj = 0,042). Na escala de 97%, as diferenças entre Humano vs. Restaurado (p-adj = 0,054) e Restaurado vs. Parque (p-adj = 0,051) apresentaram significância marginal. De notar que a comparação direta entre os extremos do gradiente — Parque e

Humano — não atingiu significância estatística após o ajuste (p-adj = 0,207 a 100%; p-adj = 0,171 a 97%). Tal resultado, face à forte significância do modelo global e ao posicionamento intermediário visualizado no NMDS, é interpretado como uma limitação do poder estatístico decorrente do tamanho amostral, não refletindo uma similaridade biológica real entre o ambiente preservado e o degradado.



r

Figura 5. Ordenação NMDS evidenciando a segregação espacial das assembleias de Psychodidae entre os habitats. Resolução ao nível de OTUs agrupadas a 97% de similaridade (Stress = 0.109).

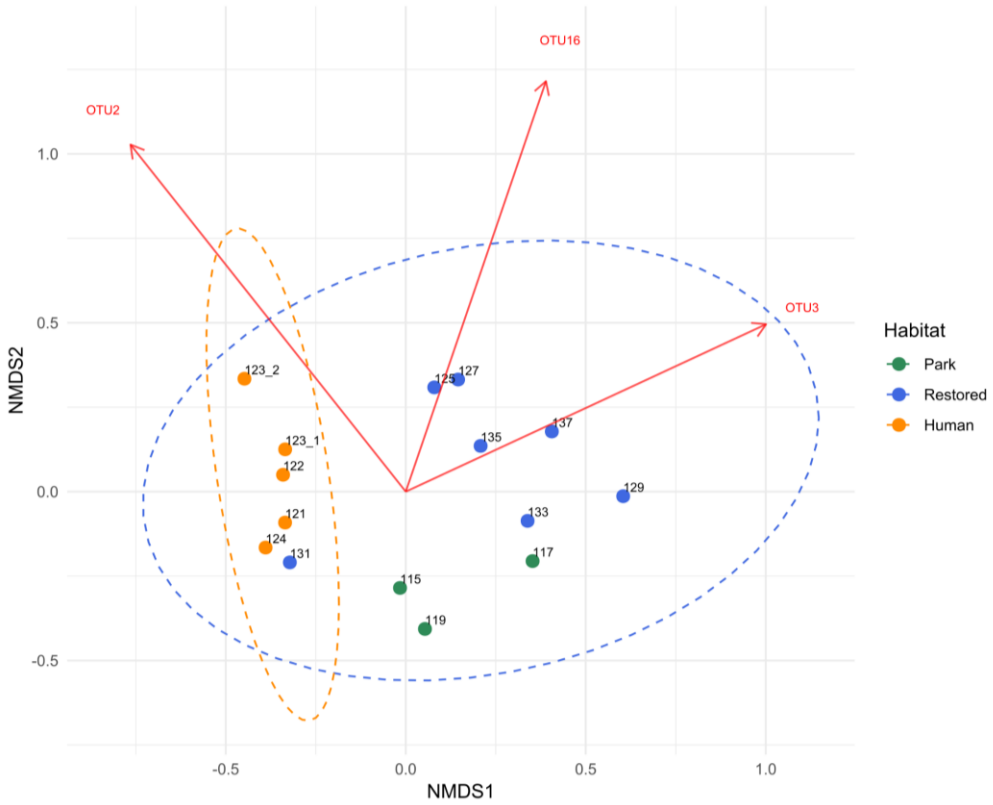


Figura 6. Ordenação NMDS evidenciando a segregação espacial das assembleias de Psychodidae entre os habitats: resolução máxima ao nível de ZOTUs a 100% (Stress: 0.15). As elipses representam o intervalo de confiança de 95%.

7.3. Diversidade Alfa: Efeito da Resolução Molecular (100% vs. 97%)

A estrutura interna das comunidades de insetos (diversidade alfa) foi avaliada sob os mesmos dois níveis de resolução molecular. Na resolução máxima de 100% (ZOTUs), os dados revelaram uma tendência visual de maior riqueza e diversidade no habitat de Parque, seguido pelas áreas Restauradas e, por fim, áreas sob impacto Humano (Figura 7). No entanto, essa variação não apresentou significância estatística para o Índice de Shannon (F = 2,029; p = 0,174) nem para a Riqueza de espécies (F = 2,256; p = 0,147).

Essa ausência de significância na escala de 100% é explicada pela elevada variabilidade intra-grupo, particularmente nas áreas em restauração, onde foram registadas desde amostras com diversidade nula até níveis comparáveis aos

fragmentos preservados. Esta heterogeneidade sugere que, na resolução de ZOTU, o "ruído" genético e estágios sucessionais distintos nas parcelas acabam por mascarar o sinal ecológico global.

Ao aplicar o limiar de 97% (OTUs), observou-se uma consolidação das sequências que reduziu a variância residual e permitiu capturar o sinal biológico com maior clareza. Nessa escala, as diferenças na estrutura da comunidade tornaram-se marginalmente significativas para a Diversidade de Shannon ($F = 3,884$; $p = 0,05$) e para a Riqueza ($F = 3,82$; $p = 0,052$). Este resultado valida estatisticamente o gradiente ecológico observado na Figura 8, evidenciando que o impacto humano reduz severamente a complexidade da assembleia, enquanto a restauração promove o retorno gradual da riqueza de táxons.

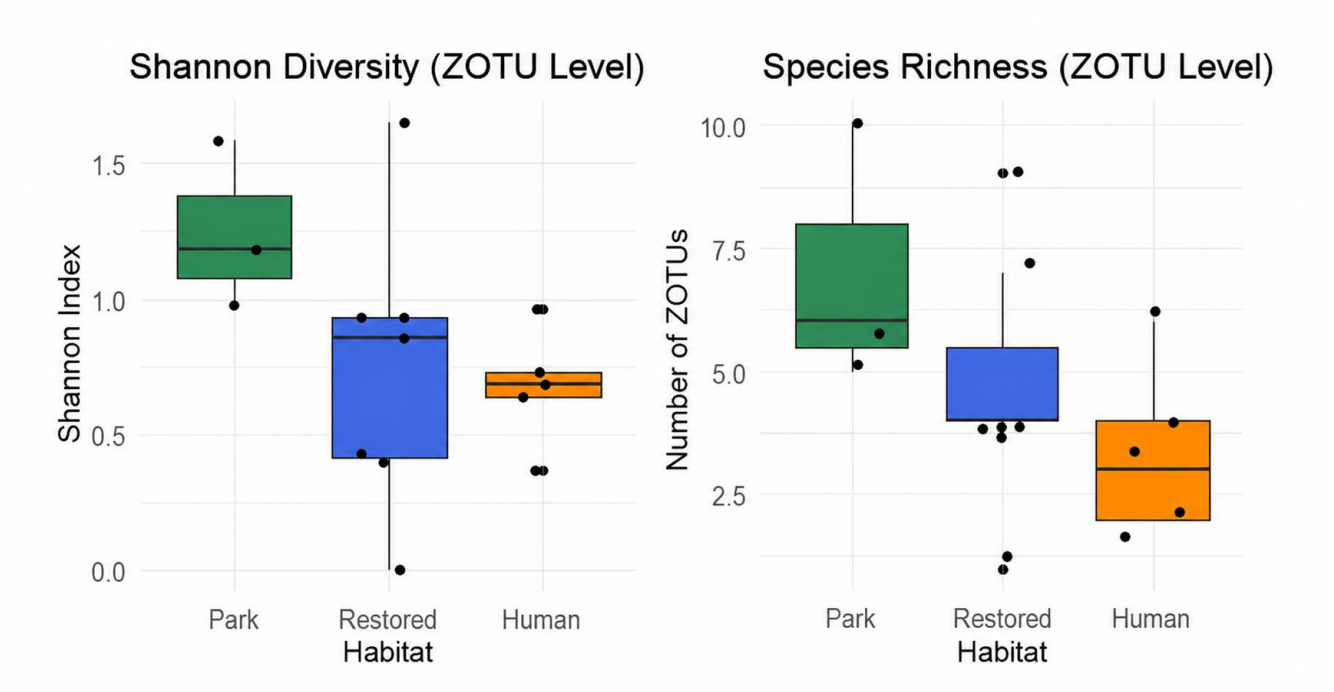


Figura 7. Diversidade alfa das assembleias de Psychodidae baseada na resolução máxima de sequências (ZOTUs a 100% de similaridade). Índice de Diversidade de Shannon e Riqueza observada de espécies. As caixas representam o intervalo interquartil (25-75%), a linha interna indica a mediana e os pontos sobrepostos representam os valores individuais de cada amostra. Observa-se uma elevada variabilidade intra-grupo, especialmente no habitat Restaurado (azul), resultando na

ausência de significância estatística entre os habitats (ANOVA; Shannon: p = 0,174; Riqueza: p = 0,147).

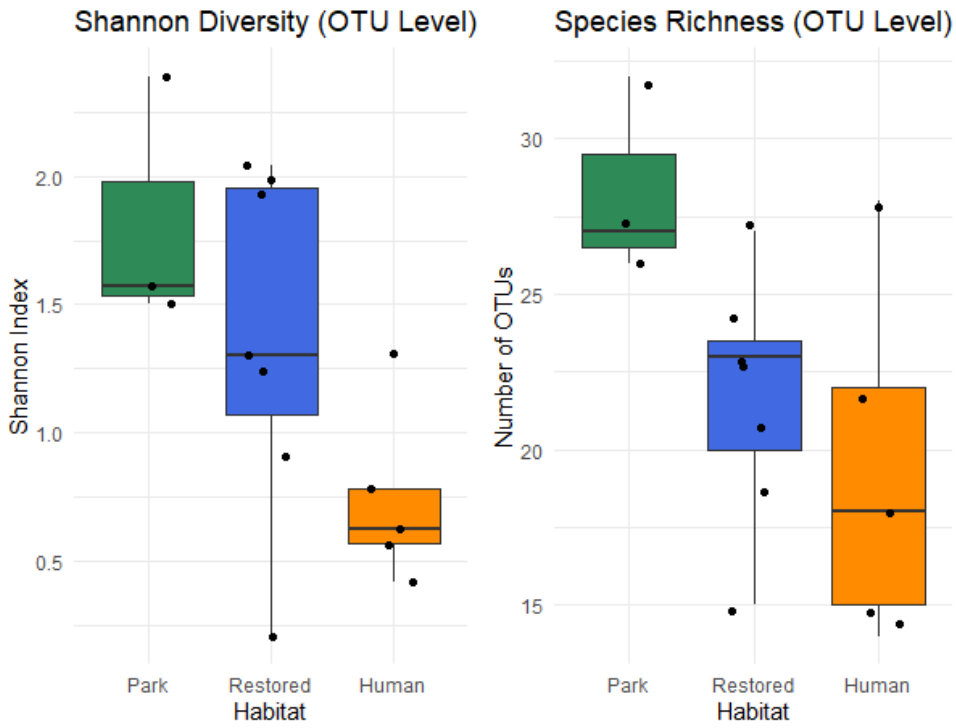


Figura 8. Diversidade alfa das assembleias de Psychodidae calculada a partir do agrupamento de sequências em OTUs (97% de similaridade). Índice de Diversidade de Shannon e Riqueza observada de espécies. A consolidação das sequências em unidades taxonômicas a 97% reduziu o ruído bioinformático, evidenciando um gradiente ecológico de degradação. As diferenças entre os habitats apresentaram significância marginal (ANOVA; Shannon: p = 0,05; Riqueza: p = 0,052), sustentando a tendência de maior complexidade biológica no Parque (verde) em comparação ao ambiente Humano (laranja).

7.4. Espécies Indicadoras e a Resposta ao Filtro Ambiental

A Análise de Espécies Indicadoras (ISA) identificou linhagens da família Psychodidae significativamente associadas aos três habitats avaliados, evidenciando respostas distintas dependendo da resolução taxonômica aplicada (Tabela 1).

No limiar de 97% de similaridade (OTUs), o ambiente de floresta preservada (Parque) abrigou a maior riqueza de linhagens indicadoras exclusivas (n = 11). Este grupo foi representado por gêneros tipicamente silvestres, como *Migonemyia* e *Trichomyia*, além de múltiplas variantes de *Psychomora*. Em contraste, o ambiente Urbano foi caracterizado por quatro OTUs indicadores (*Brumptomyia* e *Psychomora*), os quais apresentaram valores extremos de associação ao habitat, com IndVal variando entre 0,996 e 1,000 ($p \leq 0,024$). A área em Restauração apresentou dois OTUs exclusivos, ambos pertencentes ao gênero *Psychomora*.

Ao elevar a resolução para 100% (ZOTUs), o padrão de especialização se modificou. O ambiente Urbano reteve um indicador estrito e altamente significativo (ZOTU 16, gênero *Psychoda*). A área em Restauração revelou três variantes indicadoras exclusivas, distribuídas entre os gêneros *Clogmia*, *Telmatoscopus* e *Psychoda*. Diferentemente do limiar de OTUs, a área de Floresta não apresentou nenhuma ZOTU indicadora de forma isolada que atingisse significância estatística.

Tabela 1. Linhagens indicadoras da família Psychodidae identificadas via metabarcoding no Pontal do Paranapanema, detalhando a resolução taxonômica (OTU a 97% ou ZOTU a 100%), a classificação ao nível de gênero (com respectivo valor de *bootstrap*), o Valor Indicador (IndVal) e a significância estatística (*p*).

ID da Variante	Gênero Taxonômico	Confiança (Bootstrap)	IndVal	Significância (p)
Ambiente Urbano				
OTU 90 (97%)	*Brumptomyia*	58%	1,000	0,002

OTU 4 (97%)	*Psychomora*	97%	0,999	0,024
OTU 2 (97%)	*Psychomora*	100%	0,997	0,011
OTU 6 (97%)	*Psychomora*	100%	0,996	0,014
ZOTU 16 (100%)	*Psychoda*	100%	0,756	0,026
Área em Restauração				
OTU 77 (97%)	*Psychomora*	98%	0,926	0,005
OTU 10 (97%)	*Psychomora*	100%	0,850	0,015
ZOTU 18 (100%)	*Clogmia*	100%	0,816	0,034
ZOTU 58 (100%)	*Telmatoscopus*	100%	0,816	0,034
ZOTU 11 (100%)	*Psychoda*	100%	0,806	0,019

Área de Floresta (Parque)				
OTU 44 (97%)	*Migonemyia*	100%	1,000	0,004
OTU 64 (97%)	*Psychomora*	95%	0,972	0,001
OTU 18 (97%)	*Psychomora*	100%	0,939	0,007
OTU 19 (97%)	*Psychomora*	100%	0,916	0,014
OTU 149 (97%)	*Psychomora*	100%	0,903	0,004
OTU 29 (97%)	*Psychomora*	100%	0,852	0,027
OTU 333 (97%)	*Migonemyia*	94%	0,816	0,029
OTU 46 (97%)	*Trichomyia*	100%	0,804	0,050
OTU 266 (97%)	*Psychomora*	100%	0,791	0,027

OTU 121 (97%)	*Psychomora*	100%	0,764	0,018
OTU 107 (97%)	*Psychomora*	100%	0,761	0,038

7.5. Validação de Diptera como Bioindicador de Alta Resolução

A reanálise do conjunto de dados independentes iniciou-se com a avaliação da comunidade total de artrópodes, evidenciando uma diferenciação sazonal global significativa entre as estações seca e chuvosa (PERMANOVA; p = 0,001; R^2 = 0,238). A ordenação NMDS para a comunidade total (Figura 9) ilustra o padrão geral de reestruturação da macrofauna frente às mudanças climáticas de curto prazo.

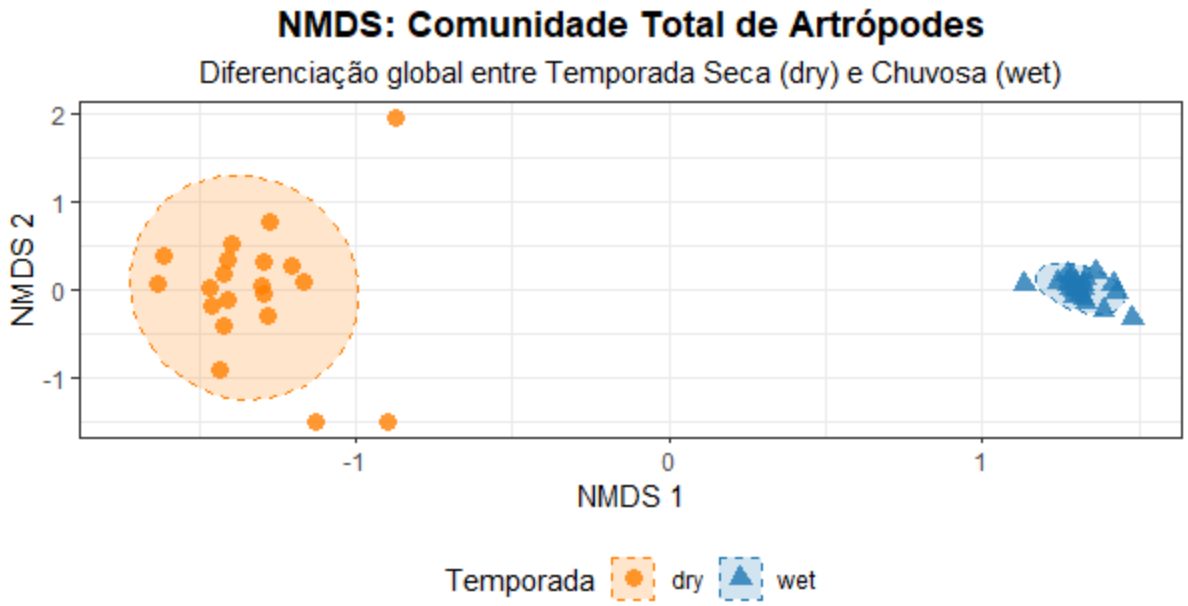


Figura 9. Ordenação NMDS evidenciando a diferenciação sazonal global (estação seca vs. chuvosa) da comunidade total de artrópodes a partir da reanálise de dados secundários. As elipses representam os intervalos de confiança de 95%.

Para identificar qual ordem de inseto responde com maior precisão e atua como o bioindicador mais sensível a essas variações (ou seja, aquele que explica a maioria da variação entre as duas temporadas), comparou-se a estruturação da ordem Diptera com Lepidoptera, um táxon amplamente utilizado em monitoramentos ecológicos clássicos e eficientemente coletado em armadilha de luz. Embora a PERMANOVA tenha revelado mudanças altamente significativas em ambas as ordens ($p = 0,001$), o poder explicativo divergiu substancialmente. A transição sazonal explicou 30,5% ($R^2 = 0,305$) da variação na assembleia de dípteros, contra apenas 22,2% ($R^2 = 0,222$) na de lepidópteros.

A ordenação NMDS comparativa (Figura 10) corroborou esta métrica, evidenciando que o isolamento espacial das comunidades entre as estações torna-se notavelmente mais agudo (menor sobreposição de elipses de confiança) no agrupamento exclusivo de Diptera. Estes resultados atestam a alta fidelidade e a sensibilidade das assembleias de dípteros a alterações ecológicas ambientais.

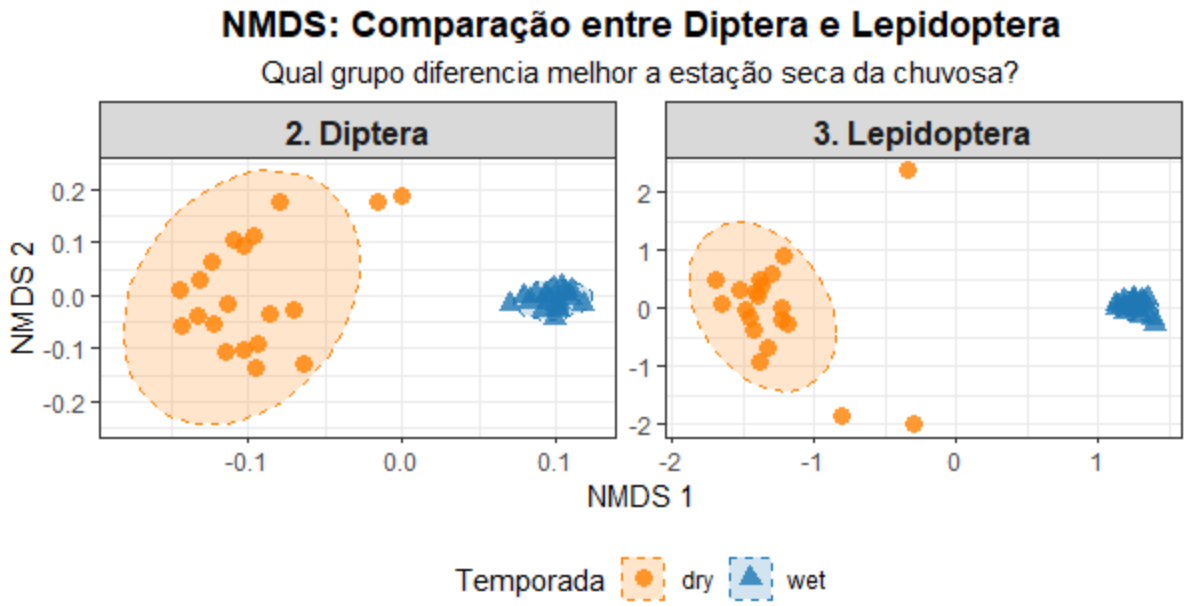


Figura 10. Ordenação NMDS comparativa evidenciando a diferenciação sazonal das comunidades de Diptera e Lepidoptera. O isolamento espacial mais agudo observado para os dípteros reflete visualmente o seu maior poder explicativo ($R^2 = 0,305$) frente às mudanças ambientais, quando

comparado aos lepidópteros (R^2 = 0,222). As elipses indicam os intervalos de confiança de 95%.

7.6. Avaliação do Desempenho das Armadilhas CDC Não Comerciais

A inspeção visual das amostras obtidas no teste piloto demonstrou que as armadilhas CDC não comerciais apresentaram um desempenho de captura comparável aos modelos comerciais padronizados. Observou-se que o volume total de biomassa e a abundância aparente de insetos voadores, particularmente pequenos dípteros, foram visualmente equivalentes entre os dois equipamentos. Essa validação preliminar confirma a eficácia técnica dos modelos de baixo custo, viabilizando o seu uso em larga escala para o monitoramento padronizado de comunidades de insetos em gradientes de antropização, sem comprometer a representatividade da amostragem para futuros estudos.



Figura 11. Protótipo de armadilha CDC não comercial em operação e o resultado de suas capturas. A eficácia técnica do equipamento de baixo custo é demonstrada pelo volume de biomassa e pela abundância de pequenos dípteros retidos nos tubos coletores durante o teste piloto, apresentando resultados visualmente equivalentes aos modelos padronizados.

8. DISCUSSÃO

8.1. A estruturação das comunidades e o papel das áreas em restauração

A profunda reestruturação espacial das assembleias de Psychodidae evidenciada pela diversidade beta (PERMANOVA global $R^2 > 0,28$) demonstra que a transição de uso e cobertura da terra atua como um forte filtro ambiental sobre a entomofauna. A substituição de espécies (*turnover*) ao longo do gradiente antropogênico corrobora a premissa de que a simplificação estrutural dos habitats e a alteração dos microclimas em matrizes urbanas e degradadas limitam a persistência de táxons florestais sensíveis, favorecendo linhagens generalistas (Didham et al., 1998; Newbold et al., 2015; Arroyo-Rodríguez et al., 2020).

O aspecto mais promissor sob a ótica da biologia da conservação é o posicionamento espacial estrito da categoria "Restaurado" no ordenamento NMDS, situando-se como um elo intermediário entre a floresta preservada (Parque) e a matriz urbana. Este padrão composicional evidencia que as áreas em restauração avaliadas não são meramente ambientes degradados em abandono, mas encontram-se em uma trajetória sucessional ativa. Conforme postulado por Chazdon (2014), a sucessão ecológica secundária em florestas tropicais promove a complexificação gradual da estrutura da vegetação, o que recria nichos ecológicos úmidos e sombreados essenciais para insetos detritívoros e fungívoros, como os psicodídeos, aproximando a assinatura biótica da área restaurada àquela observada em ecossistemas de referência.

8.2. O impacto da resolução molecular (OTU vs. ZOTU) na interpretação ecológica

A disparidade nos resultados de diversidade alfa e nas espécies indicadoras gerados pelos limiares de 97% (OTUs) e 100% (ZOTUs) ilustra um desafio central no uso do *metabarcoding* para estudos macroecológicos. A ausência de significância estatística na diversidade alfa a 100% decorreu da hipervariabilidade intra-grupo. Como as ZOTUs discriminam sequências com base em uma única substituição de nucleotídeo (variantes de sequência exatas), elas frequentemente separam polimorfismos intraespecíficos (diferentes haplótipos de uma mesma espécie) ou incorporam

artefatos de PCR como unidades independentes (Alberdi et al., 2018). Essa altíssima granularidade gerou um "ruído" que mascarou o sinal ecológico.

Por outro lado, o agrupamento tradicional a 97% (OTUs) consolidou essas variações intraespecíficas em "espécies ecológicas" (unidades taxonômicas operacionais estritas). Esta redução da variância residual foi fundamental para validar estatisticamente (margens de p=0,05) o gradiente esperado, no qual a complexidade do habitat de Parque sustenta maior diversidade e riqueza em comparação ao ambiente Humano. Estudos recentes sobre artrópodes terrestres enfatizam que, embora ZOTUs/ASVs sejam excelentes para análises filogeográficas, o limiar de OTUs a 97% frequentemente reflete a riqueza de espécies morfológicas de maneira mais precisa em comunidades hiperdiversas e pouco catalogadas genomicamente, estabilizando as métricas de diversidade ecológica (Calderón-Sanou et al., 2020).

8.3. Robustez molecular e especificidade taxonômica dos marcadores

A confiabilidade das inferências ecológicas em estudos de metabarcoding depende intrinsecamente da especificidade dos iniciadores utilizados. A validação *in silico* realizada com 9.462 sequências genômicas demonstrou que o par de primers desenhado para este estudo atua como um filtro taxonômico altamente rigoroso. A estabilidade total observada no anelamento para o grupo *Psychodidae*, em contraste com a elevada frequência de *mismatches* em outros grupos de *Nematocera*, *Diptera* e *Arthropoda*, .garante uma elevada especificidade, mitigando significativamente o ruído inespecífico e a coamplificação de táxons não-alvo. Essa especificidade molecular é o que permite afirmar, com alto grau de confiança, que a transição observada nos gráficos de ordenação NMDS reflete a biologia da família alvo e não a amplificação acidental de outros táxons da macrofauna.

8.4. Filtros ambientais e a autoecologia dos indicadores de Psychodidae

A Análise de Espécies Indicadoras (ISA) refletiu com precisão a biologia e as exigências de nicho da família Psychodidae. No agrupamento a 97%, a predominância de indicadores no Parque, representados por gêneros como *Migonemyia* e *Trichomyia*, atesta a qualidade do ambiente florestal. O gênero *Trichomyia*, por exemplo, é estritamente associado a micro-habitats florestais contendo madeira em decomposição e fungos, necessitando de alta umidade e dossel

preservado para o desenvolvimento de suas larvas (Bravo, 2001). A presença de flebotomíneos (*Migonemyia* e *Brumptomyia*) reflete a disponibilidade de seus recursos primários em áreas florestadas, como a presença de mamíferos silvestres para repasto sanguíneo e solo rico em serrapilheira para os estágios imaturos (Aguiar & Medeiros, 2003).

Em forte contraste, as linhagens indicadoras do ambiente Urbano e Restaurado (quando avaliadas a 100%) foram dominadas por táxons altamente sinantrópicos. A ZOTU 16 e ZOTU 11 (gênero *Psychoda*), juntamente com a ZOTU 18 (*Clogmia*), são os táxons mais representativos da antropização. A espécie cosmopolita *Clogmia albipunctata* e diversas espécies de *Psychoda* são conhecidas como 'moscas-de-ralo' ou 'moscas-de-filtro', frequentemente associadas a sistemas de esgoto e acúmulo de matéria orgânica líquida em domicílios. Portanto, a forte associação estatística destes gêneros com os habitats Humano e Restaurado sugere que, embora a restauração esteja progredindo composicionalmente, o solo e os micro-habitats hídricos nestas áreas ainda carregam assinaturas de matéria orgânica antropizada ou simplificação estrutural que favorecem linhagens oportunistas.

8.5. Diptera como bioindicador sensível e viabilidade metodológica

A reanálise do conjunto de dados independentes forneceu evidências substanciais de que a ordem Diptera possui um poder explicativo superior ($R^2 = 0,305$) frente a táxons classicamente utilizados no monitoramento, como Lepidoptera ($R^2 = 0,222$), na resposta a flutuações sazonais. Insetos da ordem Diptera ocupam praticamente todas as guildas tróficas terrestres e aquáticas (saprófagos, fitófagos, predadores, hematófagos) e possuem ciclos de vida geralmente mais curtos e dependentes da umidade do que os lepidópteros, o que permite respostas demográficas e composicionais muito mais rápidas a alterações microclimáticas e sazonais (Sommaggio, 1999; Brown, 2005; Adler & Courtney, 2019).

Neste contexto, a validação técnica das armadilhas CDC não comerciais (protótipos) consolida um avanço metodológico importante. Ao demonstrarem eficácia comparável aos modelos padronizados para a captura de pequenos dípteros, esses dispositivos de baixo custo eliminam barreiras financeiras e logísticas para o monitoramento em larga escala e de longa duração. Iniciativas que democratizam a

amostragem passiva são fundamentais para escalar projetos de avaliação de biodiversidade no Antropoceno, particularmente em países megadiversos e em desenvolvimento.

8.6. Limitações do Estudo e Perspectivas Futuras

Apesar dos resultados consistentes quanto à estruturação das comunidades, este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos dados. A principal restrição refere-se ao tamanho amostral total (n = 15), o qual, embora tenha sido suficiente para detectar padrões significativos na PERMANOVA global, limitou o poder estatístico das comparações par-a-par (*pairwise*). O uso de correções rigorosas para múltiplas comparações, como o ajuste de Bonferroni, aumentou a probabilidade de erro do Tipo II, mascarando diferenças biológicas reais entre os extremos do gradiente (Parque vs. Humano) que foram visualmente evidentes nas ordenações.

Além disso, a elevada variabilidade observada na resolução de 100% (ZOTUs) sugere que o ruído genético intraespecífico pode sobrecarregar métricas de diversidade alfa em amostras complexas de *metabarcoding*. Futuros estudos devem focar na expansão do esforço amostral, tanto espacial quanto temporalmente, para aumentar a robustez das inferências e permitir a modelagem de variáveis ambientais específicas (ex: umidade, temperatura e cobertura de dossel) que regem a abundância de Psychodidae.

Como perspectiva futura, o sucesso prático e operacional do uso de armadilhas CDC não comerciais neste estudo abre caminho para redes de monitoramento participativo de baixo custo em outros biomas brasileiros. Recomenda-se a aplicação da pipeline de OTUs a 97% estabelecida neste trabalho para avaliar o sucesso sucessional em projetos de restauração em larga escala, integrando dados de biodiversidade entomológica com a vigilância epidemiológica de zoonoses sob a perspectiva de Saúde Única (*One Health*).

9. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a composição das assembleias de Psychodidae variou de forma significativa entre os contextos ambientais avaliados no Pontal do Paranapanema, indicando sensibilidade do grupo às diferenças associadas ao gradiente de antropização. A análise de diversidade beta revelou que as áreas em restauração já apresentam uma assinatura biótica distinta de ambientes urbanos, ocupando uma posição intermediária em direção ao estado de referência florestal.

A identificação de OTUs indicadoras compartilhadas exclusivamente entre o Parque e as áreas Restauradas fornece evidência quantitativa do resgate da biodiversidade especialista através da restauração ativa.

A robustez dos dados apresentados é sustentada pela validação bioinformática dos marcadores moleculares. A alta especificidade dos primers, comprovada pela análise de conservação *in silico*, assegura que as distinções observadas entre os habitats de Parque, Restauração e Urbano decorrem de variações reais nas comunidades de *Psychodidae*. Desta forma, o estudo entrega não apenas um diagnóstico ecológico do Pontal do Paranapanema, mas também uma ferramenta molecular tecnicamente validada para futuras replicações.

Por fim, a combinação de ferramentas moleculares de alta resolução com tecnologias de amostragem de baixo custo (armadilhas não comerciais) mostra-se uma estratégia viável e eficiente. Esta abordagem permite democratizar o monitoramento ambiental e escalar a avaliação da resiliência de ecossistemas tropicais frente às pressões crescentes do Antropoceno.

10. REFERÊNCIAS

Adler, P. H., & Courtney, G. W. (2019). Ecological and societal services of Diptera. Annual Review of Entomology, 64, 261–278.

Aguilar, C. M., Fernandez, E., Fernandez, R., Cannova, D. C., Ferrer, E., Cabrera, E., Souza, W. J. S., & Coutinho, S. G. (1998). Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 93(Suppl 1), 15–16.

Allen, C., Brown, G. R., Clarke, L. J., & Wilkie, L. (2024). Metabarcoding reveals restoration trajectories of soil and invertebrate communities. Ecological Indicators, 163, 111715.

Allen, M. C., Lockwood, J. L., Ibanez, R., Butler, J. D., Angle, J. D., & Jaffe, B. D. (2024). eDNA offers opportunities for improved biodiversity monitoring within forest carbon markets. Communications Earth & Environment, 5, 142.

Allen, T., Murray, K. A., Zambrana-Torrelio, C., Morse, S. S., Rondinini, C., Di Marco, M., Breit, N., Olival, K. J., & Daszak, P. (2017). Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. Nature Communications, 8, 1124.

Andújar, C., Arribas, P., Yu, D. W., Vogler, A. P., & Emerson, B. C. (2018). Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the Metazoa. Molecular Ecology, 27(20), 3968–3975.

Arroyo-Rodríguez, V., et al. (2020). Designing optimal human-modified landscapes for forest biodiversity conservation. Ecology Letters, 23(8), 1404-1420.

Arroyo-Rodríguez, V., Melo, F. P. L., Martínez-Ramos, M., Bongers, F., Chazdon, R. L., Meave, J. A., Norden, N., Santos, B. A., Leal, I. R., & Tabarelli, M. (2020). Win–win ecology: Restoring tropical biodiversity and ecosystem functions. Trends in Ecology & Evolution, 35(1), 54–67.

Barnett, J. R., Facey, S. L., & Karp, D. S. (2015). Habitat and landscape determinants of Diptera diversity. Ecological Applications.

Bezerra-Santos, M. A., Dantas-Torres, F., Benelli, G., & Otranto, D. (2023). Emerging parasites and vectors in a rapidly changing world: From ecology to management. Acta Tropica, 238, 106746.

Bohan, D. A., Vacher, C., Tamaddoni-Nezhad, A., Raybould, A., Dumbrell, A. J., & Woodward, G. (2017). Next-generation global biomonitoring: Large-scale, automated reconstruction of ecological networks. Trends in Ecology & Evolution, 32(7), 477–487.

Brown, B. V. (2005). Malaise trap catches and the crisis in Neotropical dipterology. American Entomologist, 51(3), 118-120.

Bush, A., Sollmann, R., Wilting, A., Bohmann, K., Cole, B., Balzter, H., Martius, C., Zarsky, J., & Yu, D. W. (2017). Connecting Earth observation to high-throughput biodiversity data. Nature Ecology & Evolution, 1(7), 176.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. The ISME Journal, 11(12), 2639-2643.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods, 13(7), 581–583.

Caruso, T., Delgado-Baquerizo, M., & Rillig, M. C. (2019). The soil–microorganism–ecosystem feedback in restoration ecology. Nature Ecology & Evolution, 3(11), 1611–1622.

Chazdon, R. L. (2014). Second growth: The promise of tropical forest regeneration in an age of deforestation. University of Chicago Press.

Chazdon, R. L., Brancalion, P. H. S., Lamb, D., Laestadius, L., Calmon, M., & Kumar, C. (2017). A policy-driven knowledge agenda for global forest and landscape restoration. Conservation Letters, 10(1), 125–132.

Clare, E. L., Economou, C. K., Faulkes, C. G., Gilbert, J. D., Bennett, F., Drinkwater, R., & Littlefair, J. E. (2019). Measuring biodiversity from DNA in the air, water, and soil: Concepts, standardization, and perspectives. Nature Ecology & Evolution, 3(5), 689–692.

Clarke, L. J., Soubrier, J., Weyrich, L. S., & Cooper, A. (2014). Environmental metabarcodes for insects: In silico PCR reveals potential for taxonomic bias. Molecular Ecology Resources, 14(6), 1160–1170.

Courtney, G. W., Sinclair, B. J., & Meier, R. (2000). Systematics of Diptera. Annual Review of Entomology, 45, 1–22.

Creedy, T. J., Norman, H., Tang, C. Q., Chin, K. Q., Andújar, C., Arribas, P., & Vogler, A. P. (2019). A validated workflow for rapid taxonomic assignment and monitoring of a national insect collection. Methods in Ecology and Evolution, 10(6), 902–914.

Crutzen, P. J., & Stoermer, E. F. (2000). The "Anthropocene". Global Change Newsletter, 41, 17-18.

Cruz, M. F. R., Galati, E. A. B., & Cruz, C. F. (2012). Ecological aspects of the phlebotomine sand fly fauna in an American cutaneous leishmaniasis endemic area under the influence of hydroelectric plants in the Paranapanema River, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 45(4), 430–436.

Cullen Jr., L., Bodmer, R. E., & Valladares-Pádua, C. (2000). Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. Biological Conservation, 95(1), 49–56.

Curry, J. P., & Good, J. A. (1992). Soil fauna degradation and restoration. Advances in Soil Science, 17, 171–215.

da Rocha, L. S., Falqueto, A., dos Santos, C. B., & Grimaldi, G. (2013). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in an urban area of the Amazon region, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 108(8), 1049–1056.

Dean, W. (1996). With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest. University of California Press.

Deiner, K., et al. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Molecular Ecology, 26(21), 5872–5895.

Depaquit, J. (2014). Molecular systematics applied to phlebotomine sandflies: Review and perspectives. Infection, Genetics and Evolution, 28, 744–756.

Depaquit, J., Léger, N., Ferté, H., Rioux, J. A., & Killick-Kendrick, R. (1998). Molecular identification of species within the subgenus Larroussius (Diptera: Psychodidae). Parassitologia, 40(4), 329–334.

Destoumieux-Garzón, D., et al. (2018). The One Health concept: 10 years old and a long road ahead. Frontiers in Veterinary Science, 5, 14.

Díaz, S., Settele, J., Brondízio, E. S., et al. (2019). Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. Science, 366(6471), eaax3100.

Didham, R. K., Ghazoul, J., Stork, N. E., & Davis, A. J. (1998). Insects in fragmented forests: A functional approach. Trends in Ecology & Evolution, 13(8), 295–300.

Didham, R. K., Hammond, P. M., Lawton, J. H., Eggleton, P., & Stork, N. E. (1998). Beetle species responses to tropical forest fragmentation. Ecological Monographs, 68, 295–323.

dos Santos, E. M., Medeiros, J. F., & da Silva, F. J. (2022). Spatial distribution and diversity of phlebotomine sand flies in urban and periurban areas of João Pessoa, Brazil. Acta Tropica, 232, 106476.

Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: Improved error-correction for Illumina amplicon reads. bioRxiv.

Elbrecht, V., & Leese, F. (2015). Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass–sequence relationships. Methods in Ecology and Evolution, 6(9), 1059–1073.

Elbrecht, V., Vamos, E. E., Steinke, D., & Leese, F. (2017). Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data. *PeerJ, 5*, e4644.

Feliciano, C. A. (2019). Conflitos territoriais e reforma agrária no Pontal do Paranapanema. Editora UNESP.

Fernandes, B. M., Welch, C. A., & Gonçalves, E. C. (2012). Land governance in Brazil: conflicts, agrarian reform, and rural development. Land Use Policy, 29, 178–187.

Ferreira, E. D. S., Pita-Pereira, D., Andrade, J. D. D., & Brazil, R. P. (2019). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in forest fragments of Maranhão, Brazil. Parasites & Vectors, 12, 38.

Figueiredo, M. F. M., Ferreira, R. L., & Fernandes, G. W. (2015). Diptera diversity across tropical countryside landscapes. Biological Conservation, 191, 436–443.

Foley, J. A., et al. (2005). Global consequences of land use. Science, 309(5734), 570–574.

Gann, G. D., et al. (2019). International principles and standards for the practice of ecological restoration. Restoration Ecology, 27(S1), S1–S46.

Gardner, T. A., Barlow, J., Chazdon, R., et al. (2009). Prospects for tropical forest biodiversity in a human-modified world. Ecology Letters, 12(6), 561-582.

Gilbert, F. (2005). Syrphid flies as predators of aphids. Annual Review of Entomology, 50, 109–128.

Gittings, T., O'Halloran, J., Kelly, T. C., & Giller, P. S. (2006). The contribution of open spaces to the maintenance of hoverfly (Diptera, Syrphidae) biodiversity in Irish plantation forests. Forest Ecology and Management, 237(1–3), 290–300.

Gottschalk, M. S., et al. (2007). Diptera assemblages along environmental gradients. Environmental Entomology.

Grimaldi, D., & Engel, M. (2005). Evolution of the Insects. Cambridge University Press.

Grzywacz, A., Pape, T., & Szpila, K. (2017). The role of Diptera in ecosystem functioning. Insect Science, 24(4), 614–626.

Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases. Archives of Medical Research, 33, 330–342.

Guerra, J. A. O., et al. (2006). Mucocutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(6), 504–509.

Guimarães, V. C. F., Silva, R. A., & Rebêlo, J. M. M. (2019). Phlebotomine sand fly assemblages along a forest–anthropic habitat gradient in Maranhão, Brazil. Acta Tropica, 197, 105037.

Haddad, N. M., et al. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. Science Advances, 1(2), e1500052.

Hernández-Ortiz, V., et al. (2020). Arthropod Interactions and Responses to Disturbance in a Changing World. *Frontiers in Ecology and Evolution, 8*.

Hernández-Triana, L. M., Brugman, V. A., Prosser, S. W., Weland, C., Nikolova, N. I., Thorne, L., & Fooks, A. R. (2021). Molecular surveillance for arboviruses using insects: Implications for vector ecology and public health. Parasites & Vectors, 14, 412.

IPBES. (2019). Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services.

IPÊ – Instituto de Pesquisas Ecológicas. (2021). Projeto Corredores de Vida: Relatório técnico e ambiental. Nazaré Paulista, SP, Brazil.

Ji, Y., et al. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. Nature Methods, 10, 813–819.

Jones, K. E., et al. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. Nature, 451, 990–993.

Keesing, F., Holt, R. D., & Ostfeld, R. S. (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature, 468, 647–652.

Kilpatrick, A. M., & Randolph, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. Lancet, 380, 1946–1955.

Kocher, A., de Thoisy, B., Catzeflis, F., & Murienne, J. (2023). Vector metabarcoding as a tool for integrated surveillance of vector-borne diseases. Frontiers in Ecology and Evolution, 11, 1145782.

Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., et al. (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. European Journal of Soil Biology, 42, S3-S15.

Legendre, P., & Legendre, L. (2012). Numerical Ecology (3rd ed.). Elsevier.

Leite, J. F., & Cortez, A. T. C. (2013). A formação territorial do Pontal do Paranapanema e os conflitos pela terra. Revista Geografia, 38(2), 315–332.

Liddicoat, C., et al. (2022). Landscape-scale restoration drives rapid recovery of soil biodiversity and ecosystem functions. Nature Ecology & Evolution, 6, 112–124.

Londoño, C., Pérez, A., & Vélez, I. D. (2024). Environmental determinants of sand-fly diversity and Leishmania infection in Colombia. Parasites & Vectors, 17, 215.

Luz, E., et al. (2001). Lutzomyia longipalpis and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging Infectious Diseases, 7(1), 75–82.

Majer, J. D. (2009). Animals in the restoration process—Progressing the trends. Restoration Ecology, 17(3), 315–319.

Marcondes, C. B., & Day, J. F. (2019). Arthropod vectors of disease: Biology and ecology (2nd ed.). Springer.

Marcondes, C. B., & Day, J. F. (2019). Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and mosquito-borne diseases. Springer.

Marshall, S. A. (2006). Insects: Their Natural History and Diversity. Firefly Books.

Martins, A. V., Williams, P., & Falcão, A. L. (1978). *American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae).* Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.

McDonald, T., Gann, G. D., Jonson, J., & Dixon, K. W. (2016). International standards for the practice of ecological restoration. Society for Ecological Restoration, Washington, D.C.

Metzger, J. P. (2000). Tree functional group richness and landscape structure in a Brazilian tropical fragmented landscape. Ecological Applications, 10(4), 1147–1161.

Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G., & Worm, B. (2011). How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? PLoS Biology, 9(8), e1001127.

Nardi, M. S. (2010). Pesquisa de Leishmania sp. em flebotomíneos e mamíferos silvestres de fragmentos florestais na região do Pontal do Paranapanema, SP. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil.

Newbold, T., et al. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. Nature, 520(7545), 45-50.

Nichols, E., & Watkinson, A. R. (2020). The role of insects in ecological restoration. Annual Review of Entomology, 65, 61–79.

Oksanen, J., et al. (2022). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4.

Olden, J. D., Poff, N. L., Douglas, M. R., Douglas, M. E., & Fausch, K. D. (2004). Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. Trends in Ecology & Evolution, 19(1), 18–24.

Olson, S. H., Gangnon, R., Silveira, G. A., & Patz, J. A. (2010). Deforestation and malaria in Mâncio Lima county, Brazil. Emerging Infectious Diseases, 16(7), 1108–1115.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2020). *Zoonoses e doenças transmitidas por vetores*. Genebra: OMS. *(Se preferir a norma internacional, pode utilizar: World Health Organization (WHO). (2020). Zoonotic diseases).*

Orford, K. A., Vaughan, I. P., & Memmott, J. (2015). The forgotten flies: the importance of Diptera as pollinators. Proceedings of the Royal Society B, 282.

Palmer, M. A., Zedler, J. B., & Falk, D. A. (2016). Foundations of restoration ecology (2nd ed.). Island Press.

Paoletti, M. G., & Bressan, M. (1996). Soil invertebrates as bioindicators. Agriculture, Ecosystems & Environment, 74.

Patz, J. A., et al. (2004). Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. Environmental Health Perspectives, 112(10), 1092–1098.

Pedro, P. M. et al. (2021). Efficient monitoring of adult and immature mosquitoes through metabarcoding of bulk samples: A case study for non-model culicids with unique ecologies. Journal of Medical Entomology, 58(3), 1210–1218. https://doi.org/10.1093/jme/tjaa267.

PNUMA. (2020). Relatório Anual 2020: Resposta a Crises Globais. Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP).

Pollet, M. (2010). Biodiversity of Diptera in fragmented landscapes. Journal of Insect Conservation.

Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput molecular biodiversity analysis. Molecular Ecology, 27(2), 313–338.

Rader, R., et al. (2016). Non-bee insects as pollinators. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113, 146–151.

Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annual Review of Entomology, 58, 227–250.

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., et al. (2009). A safe operating space for humanity. Nature, 461(7263), 472-475.

Rodrigues, R. R., Lima, R. A. F., Gandolfi, S., & Nave, A. G. (2009). On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. Biological Conservation, 142(6), 1242–1251.

Rohr, J. R., Barrett, C. B., Civitello, D. J., et al. (2019). Emerging human infectious diseases and the links to global food production. Nature Sustainability, 2(6), 445-456.

Ruiz-Jaen, M. C., & Aide, T. M. (2005). Restoration success: How is it being measured? Restoration Ecology, 13(3), 569–577.

Rusek, J. (1984). Role of soil fauna in ecosystem processes. Pedobiologia, 27, 293–302.

Schnell, I. B., et al. (2012). Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Current Biology, 22*(8), R262-R263.

Shimabukuro, P. H. F., Silva, T. R. R., Fonseca, F. O. R., Baton, L. A., & Galati, E. A. B. (2010). Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the State of São Paulo, Brazil. Parasites & Vectors, 3, 121.

Sommaggio, D. (1999). Syrphidae: can they be used as environmental bioindicators? Agriculture, Ecosystems & Environment, 74(1-3), 343-356.

Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(36), 13486–13491.

SOUTO-VILARÓS, D. et al. Illuminating arthropod diversity in a tropical forest: Assessing biodiversity by automatic light trapping and DNA metabarcoding. Environmental DNA, v. 6, n. 2, p. e540, 2024. DOI: 10.1002/edn3.540.

Ssymank, A., et al. (2008). Pollinating flies (Diptera). Biodiversity and Conservation, 17, 217–232.

Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., et al. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. Science, 347(6223), 1259855.

Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? Annual Review of Entomology, 63, 31–45.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. Molecular Ecology, 21(8), 1789–1793.

Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biological Conservation, 183, 4-18.

Tonelli, M., Verdú, J. R., Moretti, M., & Zunino, M. (2017). Dung beetles and flies as indicators of land-use change. Ecological Indicators, 73, 57–65.

van der Heyde, M., Bunce, M., Wardell-Johnson, G., White, N. E., & Nevill, P. (2022). Testing DNA metabarcoding for monitoring restoration outcomes. Molecular Ecology, 31(9), 2405–2421.

Victor, M. A. M., Cavalli, A. C., Guillaumon, J. R., & Serra Filho, R. (2005). Cem anos de devastação: revisitada 30 anos depois. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Wortley, L., Hero, J. M., & Howes, M. (2013). Evaluating ecological restoration success: a review of the literature. Restoration Ecology, 21(5), 537-543.

Yeates, D. K., & Wiegmann, B. M. (2005). Phylogeny and evolution of Diptera. Annual Review of Entomology, 50, 153–174.

Yeates, D. K., et al. (2007). Phylogeny and systematics of Diptera. Zootaxa, 1668, 565–590.

Zinger, L., et al. (2019). DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. Molecular Ecology, 28(8), 1857–1862.

11. GLOSSÁRIO

Amplicon: fragmento de DNA produzido por meio de uma reação de amplificação por PCR.

ANOVA (*Analysis of Variance*): Análise de Variância. Procedimento estatístico utilizado para avaliar diferenças entre médias de dois ou mais grupos.

ASV (*Amplicon Sequence Variant*): Variante de Sequência de Amplicon. Sequência de DNA distinta, inferida por métodos de processamento que corrigem erros de sequenciamento, com resolução de nucleotídeo único.

Barcode (código de barras genético): sequência padronizada de DNA utilizada para auxiliar na identificação de organismos.

BIN (*Barcode Index Number*): Número de Identificação de Código de Barras Genético. Unidade de agrupamento de sequências de DNA barcoding utilizada em sistemas de identificação molecular.

Bootstrap: procedimento de reamostragem utilizado para avaliar a estabilidade ou o suporte de uma estimativa. Na classificação taxonômica, representa o suporte atribuído à identificação de determinada sequência.

Bray–Curtis dissimilarity (dissimilaridade de Bray–Curtis): medida utilizada para quantificar diferenças na composição e abundância de organismos entre amostras ou comunidades biológicas.

Bulk samples (amostras em massa): amostras compostas por múltiplos organismos coletados conjuntamente, sem necessariamente realizar a separação ou identificação individual antes da extração de DNA.

CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*): Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos. Sigla utilizada na denominação do modelo de armadilha luminosa CDC.

COI (*Cytochrome c Oxidase Subunit I*): subunidade I da enzima citocromo c oxidase, codificada pelo gene mitocondrial cox1 e amplamente utilizada como marcador molecular para identificação de animais.

cox1: gene mitocondrial que codifica a subunidade I da citocromo c oxidase, utilizado como marcador molecular em estudos de DNA barcoding.

cytB (*Cytochrome b*): gene mitocondrial que codifica a proteína citocromo b, utilizado em estudos de identificação e caracterização genética.

DADA2: pacote e algoritmo computacional utilizado no processamento de dados de sequenciamento de amplicons, incluindo modelagem de erros e inferência de variantes de sequência exatas (ASVs).

Denoising (redução de ruído): processo computacional de identificação e correção de erros introduzidos durante o sequenciamento, permitindo distinguir variações biológicas reais de erros técnicos.

DNA (*Deoxyribonucleic Acid*): ácido desoxirribonucleico, molécula responsável pelo armazenamento e transmissão das informações genéticas dos organismos.

DNA barcoding (código de barras de DNA): técnica molecular de identificação de organismos baseada na análise de uma região padronizada do material genético.

DNA metabarcoding (metabarcoding de DNA): abordagem molecular que permite identificar simultaneamente múltiplos táxons presentes em uma amostra, por meio da amplificação de marcadores genéticos e sequenciamento de alto rendimento.

eDNA (*Environmental DNA*): DNA ambiental, proveniente de vestígios genéticos presentes em amostras ambientais, como água, solo e sedimentos.

FASTA: formato de arquivo utilizado para armazenar sequências de DNA, RNA ou proteínas, acompanhado de identificadores e informações descritivas.

Framework (arcabouço conceitual): estrutura teórica ou metodológica que organiza conceitos, hipóteses e procedimentos utilizados em uma investigação científica.

High-throughput sequencing (sequenciamento de alto rendimento): tecnologia que permite obter grandes volumes de sequências de DNA simultaneamente, possibilitando análises de comunidades biológicas complexas.

iDNA (*Invertebrate-derived DNA*): DNA derivado de invertebrados, incluindo material genético de organismos ingeridos por artrópodes hematófagos ou associado aos seus tecidos.

Indexing (indexação): etapa de incorporação de sequências identificadoras às bibliotecas de DNA, permitindo reconhecer e separar as amostras após o sequenciamento multiplexado.

IndVal (*Indicator Value*): Valor Indicador. Índice utilizado para quantificar a associação de determinados táxons a condições ambientais ou tipos de habitat.

In silico: expressão utilizada para designar análises realizadas computacionalmente, em oposição a experimentos conduzidos diretamente em laboratório ou em organismos vivos.

IPBES (*Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services*): Plataforma Intergovernamental sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos.

IPÊ: Instituto de Pesquisas Ecológicas.

IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*): União Internacional de Química Pura e Aplicada. Organização responsável pela padronização internacional da nomenclatura química, incluindo códigos utilizados para representar bases nitrogenadas degeneradas em sequências de iniciadores.

ISA (*Indicator Species Analysis*): Análise de Espécies Indicadoras. Método estatístico utilizado para identificar espécies ou unidades taxonômicas associadas a determinados grupos ambientais.

LED (*Light-Emitting Diode*): Diodo Emissor de Luz, componente eletrônico utilizado como fonte luminosa em equipamentos e armadilhas de captura.

MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time of Flight*): espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo, utilizada na identificação de organismos por meio de perfis moleculares.

Malaise trap (armadilha Malaise): equipamento utilizado para capturar insetos voadores por meio de uma estrutura de interceptação física que direciona os organismos para um recipiente coletor.

Metabarcoding: identificação simultânea de múltiplos organismos presentes em uma amostra biológica ou ambiental por meio da análise de marcadores genéticos e sequenciamento de DNA.

Mismatch: incompatibilidade entre bases nitrogenadas de um iniciador (*primer*) e da sequência-alvo durante o processo de anelamento, podendo comprometer a eficiência da amplificação.

Mothur: programa computacional desenvolvido para processamento e análise de dados de sequenciamento de comunidades biológicas.

NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*): Escalonamento Multidimensional Não Métrico. Técnica de ordenação multivariada utilizada para representar graficamente as diferenças de composição entre comunidades ou amostras.

OHHLEP (*One Health High-Level Expert Panel*): Painel de Especialistas de Alto Nível em Saúde Única, responsável por contribuir para o desenvolvimento conceitual e científico da abordagem One Health.

One Health (Saúde Única): abordagem integrativa que reconhece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental.

OTU (*Operational Taxonomic Unit*): Unidade Taxonômica Operacional. Unidade de agrupamento de sequências genéticas com determinado nível de similaridade, frequentemente utilizado como aproximação de unidades taxonômicas. Neste estudo, foi considerado o agrupamento a 97% de similaridade.

Overhangs: sequências adicionais de nucleotídeos incorporadas às extremidades dos iniciadores, permitindo a posterior adição de adaptadores necessários ao sequenciamento Illumina.

Paired-end sequencing (sequenciamento de extremidades pareadas): estratégia de sequenciamento na qual ambas as extremidades de um fragmento de DNA são sequenciadas, produzindo duas leituras correspondentes que podem ser posteriormente combinadas.

Pairwise comparisons (comparações par a par): procedimentos estatísticos destinados a comparar individualmente os grupos de um experimento, considerando duas condições ou tratamentos por vez.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reação em Cadeia da Polimerase. Técnica molecular utilizada para amplificar regiões específicas do DNA. PCR1 e PCR2 correspondem, respectivamente, à primeira etapa de amplificação e à segunda etapa, destinada à incorporação dos índices e adaptadores de sequenciamento.

PCR multiplex: modalidade de reação em cadeia da polimerase na qual diferentes regiões-alvo são amplificadas simultaneamente, utilizando múltiplos pares de iniciadores.

PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*): Análise de Variância Multivariada Permutacional. Método estatístico utilizado para avaliar diferenças na composição de comunidades biológicas entre grupos, com base em matrizes de dissimilaridade e permutações.

Pitfall trap (armadilha de queda): método de amostragem de invertebrados terrestres no qual recipientes instalados no solo capturam organismos que se deslocam sobre sua superfície.

PNUMA (*United Nations Environment Programme* – UNEP): Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente.

Primer (iniciador): pequena sequência sintética de nucleotídeos que delimita a região de DNA a ser amplificada durante a PCR. Os iniciadores podem ser classificados como forward (direto) e reverse (reverso).

Primer bias (viés de iniciadores): amplificação desigual de diferentes táxons decorrente de diferenças na complementaridade entre os iniciadores e as sequências-alvo, podendo favorecer determinados organismos em detrimento de outros.

Proxy (indicador substituto): variável ou medida utilizada como representação indireta de uma característica ou processo ecológico que não é mensurado diretamente.

R: ambiente e linguagem de programação utilizados para análises estatísticas, processamento de dados e representação gráfica.

RDP (*Ribosomal Database Project*): Projeto de Banco de Dados Ribossomais, que disponibiliza sequências de referência e ferramentas de classificação taxonômica.

Reads (leituras de sequenciamento): sequências individuais de nucleotídeos produzidas pela plataforma de sequenciamento.

Salting out (precipitação salina): método de extração de DNA baseado na utilização de altas concentrações de sais para promover a separação de proteínas e outros componentes celulares, permitindo a recuperação do DNA por precipitação alcoólica.

Sequence Logo (logotipo de sequência): representação gráfica da conservação e frequência de nucleotídeos em cada posição de um conjunto de sequências alinhadas. A altura de cada letra representa sua frequência relativa e contribuição para o conteúdo de informação.

Shannon (índice de diversidade de Shannon): índice ecológico utilizado para estimar a diversidade de uma comunidade, considerando simultaneamente a riqueza de táxons e a distribuição relativa de suas abundâncias.

Spillover (transbordamento zoonótico): processo pelo qual um agente infeccioso passa de uma espécie hospedeira para outra, incluindo eventos de transmissão entre animais e seres humanos.

Stress (índice de estresse da NMDS): medida que representa a discrepância entre as distâncias originais dos dados e as distâncias representadas na ordenação multidimensional. Valores menores indicam melhor representação das relações de dissimilaridade.

Turnover (substituição de espécies): componente da diversidade beta que representa a substituição de espécies entre diferentes comunidades ou ambientes.

UNOISE3: algoritmo computacional de redução de erros e inferência de unidades de sequência exata, utilizado em análises de dados de metabarcoding.

USEARCH: programa computacional utilizado para processamento, comparação, agrupamento e análise de sequências biológicas.

vegan: pacote do ambiente R destinado a análises de ecologia de comunidades, incluindo diversidade, ordenação e testes multivariados.

WHO (*World Health Organization*): Organização Mundial da Saúde (OMS).

***ZOTU* (*Zero-radius Operational Taxonomic Unit*):** Unidade Taxonômica Operacional de Raio Zero. Unidade molecular correspondente a uma sequência exata, sem agrupamento por limiar de similaridade, utilizada para representar variantes de DNA em alta resolução.