

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações

Chamada INCT - CNPq nº 58/2022

Metrologia Forense e Rastreabilidade na Qualidade Agroambiental - MRFor



Brasil

Setembro/2022

a. Solicitante: Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) - Universidade de São Paulo (USP)

b. Membros da Equipe: Luiz Antonio Martinelli (Coordenador), Tsai Siu Mui, Camila Maistro Patreze, Gabriela Bielefeld Nardoto, Paulo José Duarte Neto, Rogério Eiji Hanada, Lucas William Mendes, Elisabete Aparecida de Nadai Fernandes, Plínio Barbosa de Camargo, Hudson Wallace Pereira de Carvalho, Daniel Saito, Giuliano Masselli Locosselli, Maria Victoria Ramos Ballester, Marcelo Zacharias Moreira, Thiago de Araújo Mastrangelo, Marli de Fátima Fiore, Victor Alexandre Vitorello, Valéria Magalhães Aguiar, Elvis Joacir De França, Gabriel Adrián Sarriés, Márcio Arruda Bacchi, Antonio Zamunér Filho, José Lavres Junior, Niro Higuchi, Antônio Vargas de Oliveira Figueira, Fabio José Viana Costa, Jorge Marcelo de Freitas, Adriano José Nogueira Lima, Tiago Alessandro Espínola Ferreira, Tatijana Stosic, Borko Stosic, Antônio Samuel Alves da Silva, Jader da Silva Jale, Kleber Napoleão, Flávia Visch Winck, Diego Maurício Riano Pachón, Ernani Pinto Junior, Clíssia Barboza da Silva.

c. Nome do INCT: Metrologia Forense e Rastreabilidade na Qualidade Agroambiental - MRFor.

d. Instituições participantes do INCT: Universidade de São Paulo (USP), Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA); Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Universidade de Brasília (UnB), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

e. Palavras-chave: Biodiversidade, *Networking Startup*, Diagnose Forense, *DNA barcoding*, floresta tropical, material de referência, Nanotecnologia; *Machine Learning*; modelagem espacial; análise forense; isótopos estáveis; *Isoscapes*.

f. Resumo da Proposta: O Centro "Metrologia Forense e Rastreabilidade na Qualidade Agroambiental – MRFor" concentra-se na realização de pesquisas básicas e aplicadas de forma inovadora e robusta em questões importantes de rastreabilidade científica em apoio à sustentabilidade da agricultura moderna e monitoramento florestal na Amazônia e na Mata Atlântica. O MRFor reúne uma equipe de trabalho com pesquisadores de reconhecida liderança na área no Brasil, nas áreas de ecologia isotópica, ecologia microbiana e molecular, georreferenciamento e modelagem espacial, e será complementada pela participação de pesquisadores associados. Com o contínuo desenvolvimento e aplicação de ferramentas consolidadas, o grupo buscará disseminar o conhecimento e a transferência de tecnologia para a sociedade. Terá uma atuação destacada em questões forenses com base na rastreabilidade por meio de identificadores únicos e inequívocos, buscando desenvolver protocolos

específicos que atribuem selos de qualidade e origem agroambiental, como parte da estratégia de valorização de bens e produtos. Ao implementar sistemas de rastreabilidade centrados em metadados e nanotecnologia, os interessados poderão compartilhar de forma inteligente, cruzando informações com sistemas conectados em qualquer ponto da cadeia produtiva. Tecnologias como bioinformática e redes na forma de plataformas colaborativas permitem aumentar a eficácia dos sistemas de rastreabilidade, oferecendo relatórios detalhados sobre o estado e as inovações a serem obtidas pela equipe do MRFor, criando ligações diretas entre os atores ao longo da cadeia, desde os produtores até usuários finais. A equipe de pesquisa tem desenvolvido vínculos importantes com empresas agrícolas do setor agroindustrial para exportação de commodities agrícolas e, nos últimos anos, a necessidade de garantia de qualidade desde a produção agrícola sustentável da fazenda até os consumidores. Seis sub-projetos irão consolidar estratégias de rede para implementar sistemas de rastreabilidade centrados em metadados e inteligência artificial, as partes interessadas poderão compartilhar de forma inteligente, cruzando informações com sistemas conectados em qualquer ponto da cadeia produtiva desde a produção agrícola, conservação de florestas tropicais até dar suporte às políticas públicas do Governo Brasileiro para solucionar questões complexas para a agricultura sustentável e a preservação do meio ambiente. Os sub-projetos envolverão o desenvolvimento e aplicação de (a) técnicas analíticas isotópicas e nucleares, (b) *nanofingerprinting* para rastreabilidade e autenticidade na agricultura e cadeias de produção de madeira - do solo à produção agroalimentar e de madeira, (c) rastreabilidade de o destino da madeira derivada da extração ilegal de madeira em floresta tropical, aplicando métodos isotópicos forenses, (d) *DNA barcoding* na biodiversidade, rastreabilidade e estudos de conservação de florestas tropicais nativas, (e) rastreabilidade da degradação dos ecossistemas terrestres e da biodiversidade associada como base para uma melhor conservação, restauração e remediação e (f) construção de um sistema de atribuição geográfica de amostras de vestígios criminais eficiente para o território brasileiro com base nessas premissas, e que possa ser utilizado efetivamente pelos órgãos de segurança nacionais e estaduais.

g. Qualificação do Problema sob o ponto de vista científico, tecnológico e de inovação:

A redução da criminalidade no Brasil passa pela necessidade de investimentos de longo prazo não só em contenção como também em melhores condições de investigação dos crimes cometidos (Odon, 2018). Os estudos científicos que buscam auxiliar o desempenho da Polícia nestas investigações têm proporcionado diversos avanços em setores como rastreabilidade de drogas (Matielo et al., 2019), identificação de tempo pós-morte (Javan et al., 2016) e combate ao tráfico de animais (Chesson et al., 2018). Dessa forma, o incentivo a estudos com temática forense pode e deve ser ampliado de forma a garantir que mais dados sejam gerados para auxiliar na resolução de crimes.

Um dos maiores desafios da polícia brasileira nesse sentido é conseguir rastrear evidências criminais. Materiais como madeira, partes de animais silvestres e solo, por exemplo, são difíceis de identificar como oriundas de contrabando e/ou extração ilegal se não forem apreendidas em flagrante

(Miranda et al., 2014). A solução para isso, no entanto, pode estar em três técnicas moleculares distintas mas que podem atuar em conjunto para mapear evidências policiais e ajudar as forças de segurança a rastrear a origem de materiais: a análise de ácidos desoxirribonucleicos (DNA), a análise de isótopos estáveis e radioativos e a nanotecnologia (Costa et al., 2018).

Num contexto em que o desmatamento cresce vertiginosamente na Amazônia, perdendo cerca de 8% de toda floresta nos últimos 33 anos para pastagens, áreas agrícolas e para a exploração madeireira (Alves-Pinto et al., 2017) e que a Mata Atlântica, segunda maior floresta tropical pluvial do continente americano e que abriga grande parte dos maiores polos industriais, químicos, petroleiros, portuários e turísticos do país, apresenta apenas 11% de sua área original recoberta (REZENDE et al., 2018), é imprescindível lançar mão de todas as alternativas disponíveis para fiscalizar e garantir que a exploração da floresta não ocorra de maneira ilegal. Por tal razão, esta proposta aborda de forma ampla o campo dos estudos moleculares a fim de prospectar melhores diagnósticos ambientais de rastreabilidade para madeira, alimentos, solo e árvores, produzindo um mapa molecular das matas brasileiras e do que as compõem.

h. Objetivo: O objetivo é consolidar um centro de excelência para o estabelecimento de plataformas de *networking* para transferência de conhecimento e tecnologia de soluções inovadoras em metrologia e rastreabilidade aplicadas a questões complexas relativas à agricultura sustentável e à conservação do meio ambiente tropical.

i. Objetivos específicos: Desenvolvimento e aplicação de (a) técnicas analíticas isotópicas e nucleares, (b) nano impressão digital para rastreabilidade e autenticidade na agricultura e cadeias de produção de madeira - do solo à produção agroalimentar e de madeira, (c) rastreabilidade do destino da madeira derivada da extração ilegal de madeira em floresta tropical, aplicando métodos isotópicos forenses, (d) *DNA barcoding* na biodiversidade, rastreabilidade e estudos de conservação de florestas tropicais nativas, (e) rastrear a degradação dos ecossistemas terrestres e da biodiversidade associada como base para uma melhor conservação, restauração e remediação e (f) construir de um sistema de atribuição geográfica de amostras de vestígios criminais eficiente para o território brasileiro com base nessas premissas, e que possa ser utilizado efetivamente pelos órgãos de segurança nacionais e estaduais.

j. Contextos metodológicos da proposta:

Os procedimentos do INCT MRFor serão desenvolvidos de maneira independente entre os seis subprojetos, mas buscando a interdisciplinaridade e a correlação entre cada um. Cada subprojeto é discriminado abaixo.

O material e os métodos da proposta também são resumidos pelo panorama geral de análises (Figura 1) e pelos *frameworks* das diferentes análises isotópicas (Figura 2), moleculares (Figura 3) e do sistema de atribuição geográfica (Figura 4).

SUB-PROJETO (SP) 1. Técnicas de análise isotópica e nuclear para agricultura e meio ambiente

EQUIPE DE TRABALHO: Elisabete A. De Nadai Fernandes, Elvis Joacir De França, Gabriel A. Sarriés, Márcio Arruda Bacchi, Antonio Zamunér Filho

Lantânia e lantanóides perfazem um grupo coeso de elementos químicos de grande importância industrial e ambiental. São empregados na confecção de semicondutores, de catalisadores, de imãs potentes, na metalurgia, em radiofármacos, na agricultura, cujo aumento de produtividade agrícola tem sido observado para as culturas da soja, arroz, milho, alho e feijão, por exemplo (Tommasi et al., 2021) e na produção animal. Por outro lado, efeitos negativos relacionados com o aumento da disponibilidade de lantânia e lantanóides também são bastante encontrados em plantas, incluindo a perturbação do modelo coeso de distribuição (França et al., 2002). Considerado o país da megabiodiversidade, o Brasil apresenta tipos vegetacionais expressivos, biomas com muitas espécies vegetais e animais endêmicas, além da biodiversidade associada a recursos hídricos como rios e oceanos. Soma-se o fato de possuir diversidade mineralógica ímpar, sobretudo solos com características específicas e plantas totalmente adaptadas. A partir disso, cresceu a preocupação em medir os efeitos econômicos de obstáculos ao comércio internacional de *commodities* e produtos brasileiros do setor agroindustrial, que evoluíram consideravelmente com o advento de barreiras não tarifárias, como as exigências de controle sanitário, fitossanitário, radiológico, qualidade e segurança dos produtos, bem como a limitação aos bens produzidos em condições impactantes ao meio ambiente. O agronegócio brasileiro consolida sua presença no mercado mundial, buscando essencialmente melhores níveis de competitividade e sustentabilidade ambiental, por meio do fortalecimento da competência e capacidade analítica para promover elevados padrões de qualidade, segurança e certificação de acordo com os requisitos internacionais. Para alcançar a excelência analítica em alto nível metrológico, é essencial estabelecer competência para o desenvolvimento e certificação de materiais de referência biológicos e ambientais e gestão de rodadas de ensaios de proficiência laboratorial, garantindo autonomia e independência tecnológica para o país. Ao longo dos últimos vinte anos, a equipe desenvolveu uma sólida infraestrutura laboratorial, estabelecendo procedimentos analíticos avançados baseados em técnicas isotópicas e nucleares, que têm contribuído com soluções relevantes para o agronegócio com visibilidade e liderança sob o foco de metrologia e rastreabilidade. Abordagens inovadoras com técnicas multielementares e de mineração de dados têm sido implementadas para estudar ecossistemas aquáticos e terrestres, estado de sedimentação na Bacia Amazônica e na Plataforma Continental Amazônica, biomonitoramento de ecossistemas úmidos em

regiões urbanas e naturais sobre compartimentos ecológicos de sedimento-vegetação, aves, anfíbios e insetos, ciclagem de elementos químicos solo-planta-lixo em unidades de conservação da Mata Atlântica como mecanismo de sustentabilidade do ecossistema e estabelecimento de padrões ambientais de referência para espécies arbóreas nativas dos biomas Mata Atlântica e Cerrado. O paleoclima nos biomas Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal está sendo elucidado por meio da integração de ferramentas de caracterização cronológica, como datação C-14, sedimentologia, geoquímica convencional e isotópica e palinologia permitindo estudos sobre evolução da paisagem e dinâmica da paleovegetação, com inferências sobre as mudanças climáticas. Registros de mudanças paleoambientais e paleoclimáticas nos últimos ~50.000 anos BP foram caracterizados com dados faciológicos, isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) e C/N juntamente com aqueles obtidos de pólen e esporos e de macro fragmentos de carvão. Tudo isso fornece informações únicas sobre processos sedimentares, fontes de matéria orgânica, padrões e dinâmicas de paleovegetação e paleofogos, permitindo a reconstrução precisa de mudanças paleoambientais e inferências paleoclimáticas, bem como sobre a vegetação dominante nessas regiões tropicais. Registros biogeoquímicos de análise de substratos solo/sedimento e anéis de crescimento de espécies arbóreas de florestas e manguezais, isótopos estáveis de C e N, pólen, datação por C-14 e Pb-210, e distribuição granulométrica, são importantes para estimar condições climáticas e condições ambientais.

Resultados esperados: (i) Estabelecimento de padrões vegetais utilizados como materiais de referência certificados a partir de matrizes de espécies florestais de interesse econômico com riscos de extração ilegal de madeira nos biomas Amazônia e Mata Atlântica, com a introdução de métodos anatômicos e genéticos (interação com SP 4), além de métodos físico-químicos (interação com SP 2 e SP 3), para rastreabilidade de origem geográfica; (ii) Discriminação dos sistemas de produção agrícola para autenticidade agroalimentar (interação com SP 2); (iii) Desenvolvimento de modelos preditivos relacionados à dinâmica dos ecossistemas em ambientes tropicais (florestas, campos, manguezais) frente às mudanças climáticas e ambientais. Este SP 1 permite a associação com os dados do SP 3, para um diagnóstico mais claro dos eventos ocorridos nas áreas preservadas e desmatadas e suas fitofisionomias.

SUB-PROJETO 2: Nano Fingerprinting – Uma nova ferramenta para rastreabilidade e autenticidade na agricultura e ambiente

EQUIPE DE TRABALHO: Hudson Wallace Pereira de Carvalho, José Lavres Junior, Flávia Vischi Winck, Diego Maurício Riaño-Pachón.

A rastreabilidade e a autenticidade dos agroalimentos e o rastreamento da extração ilegal de madeira nas florestas tropicais são altamente relevantes do ponto de vista científico, econômico e de saúde pública, bem como para questões de conservação florestal. Métodos cromatográficos e

espectrométricos como espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massa são alternativas capazes de revelar com precisão se um determinado alimento foi adulterado, mas são limitados pela rastreabilidade do alimento e identificação de origem geográfica. Apesar da análise de isótopos estáveis imprimirem uma assinatura única na composição química que revela a origem de alimentos e madeira, uma das suas limitações consiste na dificuldade de distinguir fazendas vizinhasumas das outras, dificultando assim a rastreabilidade e autenticidade dos alimentos da fazenda ao prato. Dessa forma, este eixo temático propõe uma abordagem complementar para garantir a origem geográfica, designação do agricultor, rastreabilidade e autenticação. Baseia-se no desenvolvimento de “nano impressões digitais” não tóxicas, adequadas para inserção em diferentes etapas da cadeia produtiva, ou seja, desde a propriedade agrícola ou desde as propriedades legais de produção de madeira até as etapas de processamento, armazenamento e transporte. Para as questões de conservação da floresta tropical, uma forma de combater a extração ilegal de madeira na Amazônia é rastrear a madeira desde sua origem, tomando medidas desde a composição do solo até os depósitos de madeira, a fim de impedir a extração ilegal de madeira que prejudica o comércio de madeira legal e bem manejada por responsáveis empresas. As informações serão codificadas por três principais níveis hierárquicos inerentes à química das nanopartículas: composição química, composição isotópica e tamanho. Para cada nível principal existem vários subníveis e suas combinações, o que leva a uma diversidade de códigos possíveis. Uma vez formulada, a *Nano fingerprint* pode ser transmitida ao solo, pulverizada nas plantas ou durante as operações de processamento da unidade. A decodificação ou simplesmente a leitura da *Nano fingerprint* pode ser realizada por espetrometria de massa de plasma acoplada indutivamente de partícula única. Essa técnica é capaz de detectar sinais transitórios provenientes de nanopartículas de tamanhos específicos e em concentrações da ordem de picogramas por quilograma. Conscientes das possíveis preocupações relacionadas com a introdução de nanopartículas na cadeia alimentar, vamos aproveitar a multidisciplinaridade da equipe para conceber nanomateriais menos tóxicos para células e animais, bem como avaliar os seus efeitos em organismos modelo, com o objetivo de garantir a confiabilidade da proposta. O nível tecnológico envolvido na fabricação de *barcodes* nanométricos, bem como em sua leitura, desestimularia fraudes e impossibilitaria a falsificação de alimentos. Como vários barcodes podem ser produzidos, além de imprimir aos alimentos a exata origem geográfica ou de processamento, a proposta permitiria a introdução de uma assinatura de tempo.

Resultados esperados: (i) Uma pesquisa bibliográfica recente não revelou nenhum registro de uma proposta semelhante, enfatizando que estamos diante de uma abordagem única e original de rastreabilidade de alimentos, com potencial para avançar também a fronteira do conhecimento tanto na síntese de nanoestruturas quanto na capacidade detectar nanopartículas; (ii) Além da produção de conhecimento, do ponto de vista tecnológico e econômico, a proposta tem potencial para gerar

tecnologia capaz de atingir ambos nichos de mercado com altíssimos benefícios; (iii) Além disso, criar um sistema inovador para fornecer solução para a indústria de alimentos altamente processados ou também para verificar, licenciar ou certificar a madeira como legal; (iv) Este sistema pode dar suporte adicional para avaliação e monitoramento da extração ilegal de madeira que ocorre nos biomas Amazônia e Mata Atlântica.

SUB-PROJETO 3. Rastreabilidade do destino da madeira oriunda de extração ilegal de madeira em floresta tropical úmida, aplicando métodos isotópicos forenses

EQUIPE DE TRABALHO: Niro Higuchi, Luiz Antonio Martinelli, Plínio de Barbosa Camargo, Marcelo Zacharias Moreira, Adriano José Nogueira Lima, Gabriela Bielefeld Nardoto, Giuliano Masseli Locosselli.

A atividade humana tem sido a grande responsável pelo aumento do desmatamento nos biomas Amazônia e Pantanal. O Laboratório de Isótopos Estáveis da Divisão de Funcionamento de Ecossistemas Tropicais do CENA/USP está participando ativamente de uma nova área de atuação – isótopos forenses, do Ministério do Meio Ambiente. O Laboratório teve participação especial na formação e capacitação técnico-científica nesta área de pesquisa de especialistas do IBAMA e Secretarias Estaduais de Meio Ambiente. Essa linha inovadora de rastreabilidade científica baseia-se na análise da razão isotópica de vestígios de materiais como forma de elucidação de crimes ambientais, por meio de um sistema nacional de controle que integra dados sobre a origem da madeira, carvão e outros produtos ou subprodutos florestais, sob a coordenação, fiscalização e regulamentação do IBAMA. Essa ação envolve peritos criminais da federação, para rastreabilidade com auxílio de técnicas isotópicas, genética forense, dados sociais, ambientais e econômicos, em conjunto com a Academia Brasileira de Ciências Forenses. Com o entendimento recente de que os países desenvolvidos consolidaram o uso de isótopos estáveis em seus órgãos de segurança, o Ministério do Meio Ambiente está propondo a criação do Laboratório Nacional de Isótopos Forenses - LANIF, viabilizando impressões digitais semelhantes ao DNA. O pesquisador Dr. Niro Higuchi, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), lidera a área de Recursos Florestais e Engenharia Florestal, com ênfase em Inventário e Manejo Florestal. Esta linha de pesquisa apoia estudos básicos sobre estrutura, dinâmica, estoque de carbono e reciclagem de nutrientes no ecossistema florestal.

Resultados esperados: (i) Construção de isoscapes, exigindo a constituição de uma base de dados com valores isotópicos distribuídos espacialmente sobre a área geográfica de interesse; (ii) Elaboração de mapas compostos por isolinhas contemplando a variabilidade espacial dos isótopos de interesse (oxigênio), determinados em matrizes de interesse (madeira); (iii) Atribuição de origem propriamente dita através de métodos estatístico-espaciais; (iv) Esses estudos serão cruciais para avaliar a resiliência

da floresta com determinações de longo prazo das mudanças nas taxas de evapotranspiração, temperatura, umidade e estrutura das espécies com maior risco de perda por morte natural e, ao mesmo tempo, obter a inventário florestal para manejo e preservação de matrizes-madeiras estratégicas para preservação florestal; (v) Tais dados podem auxiliar na rastreabilidade da origem da madeira, carvão vegetal e outros produtos ou subprodutos florestais, em diagnósticos forenses para fins de fiscalização e regulamentação do IBAMA. Este SP 3 interage diretamente com SP 1 e SP 4.

SUB-PROJETO 4. Biodiversidade, rastreabilidade e conservação de solos e de florestas nativas tropicais

EQUIPE DE TRABALHO: Lucas William Mendes, Antônio Vargas de Oliveira Figueira, Camila Maistro Patreze, Tsai Siu Mui, Rogério Eiji Hanada; Daniel Saito, Victor Alexandre Vitorello, Maria Victoria Ramos Ballester, Marli de Fátima Fiore, Ernani Pinto Junior.

A rastreabilidade pode ser desenvolvida com *DNA barcoding* para identificação de espécies através do uso de regiões específicas de sequências de DNA. Ainda há desafios na aplicação desta técnica, pois requer conhecimento multidisciplinar quando se pretende identificar espécies irmãs em uma escala geográfica mais ampla. Em plantas, trabalhos recentes demonstraram a possibilidade de aplicação de um sistema baseado em múltiplos genes de cloroplastos, quando a escala geográfica de diferenciação é maior. A discriminação entre múltiplas populações por este sistema permitiu a identificação de subgêneros de acácia pantropical em três regiões distintas – Índia, África e Austrália. O uso de três regiões do cloroplasto – *rbcL*, *matK* e *trnH-psbA* foi suficientemente robusto para discriminar espécies irmãs e diferenciar padrões biogeográficos distintos entre as populações das regiões. Segundo esses autores, o sistema de *barcode* estabeleceu claramente o poder do código de barras de DNA para estudos taxonômicos e biogeográficos. Assim, pode-se identificar espécies crípticas, bem como padrões biogeográficos para obter classificação em nível de gênero e espécie. O gene *matK* mostrou-se mais discriminante que o *rbcL*, chegando a 90% de amplificação em angiospermas, 83% em gimnospermas e 10% em criptógamas, trouxe resolução em nível de família e classe, mas com ação discriminante moderada em nível de espécie. A análise molecular da biodiversidade dos solos é uma ferramenta que permite avaliar a qualidade do solo, identificando diferentes usos da terra e graus de degradação, fornecendo informações que podem auxiliar na conservação de ecossistemas. Para a identificação das espécies de microrganismos do solo, serão sequenciados o gene 16S ribosomal (bactérias e arquéias) e ITS (fungos). Muito recentemente, avanços tecnológicos por sequenciamento via sistema Oxford Nanopore® foram testados com sucesso em estudos para entender, caracterizar e monitorar a biodiversidade, obtendo o código de barras pelo MinION™. O sistema foi desenvolvido via “inovação por subtração”, sendo bastante simples de ser implementado em laboratório, que opera por um baixo custo operacional, além de resultados obtidos em poucos dias. Esta técnica está sendo adotada porque permite aumentar o número de amostras a um

custo razoavelmente baixo devido ao alto nível de resolução. Os *barcodes* das sequências de DNA geradas pelo MinION™ podem melhorar a acurácia da identificação taxonômica por permitir o sequenciamento de amplicons mais longos, além de poderem ser combinados em uma mesma *Flow cell*, otimizando o processo de sequenciamento.

Resultados esperados: (i) Desenvolver *barcodes* utilizando sequências de DNA para as principais árvores nativas em regiões com alto risco de desmatamento para o comércio ilegal de madeira, tanto para estudos da diversidade genética dessas árvores na região quanto para estudos forenses após o corte ilegal de suas madeira. (ii) Estudar as áreas designadas já identificadas com exploração madeireira ilegal intensiva na Amazônia e na Mata Atlântica, conectando os SPs 1, 2 e 3 e usando a abordagem genética (i) para as principais espécies ameaçadas devido ao desmatamento ilegal; (iii) O desenvolvimento de protocolos usando sequenciamento de organelas ou DNA nuclear em larga escala poderia complementar os SP 1, 2 e 3.

SUB-PROJETO 5. Análise da diversidade de dípteros baseados em taxonomia morfológica e molecular em áreas agrícolas e florestais

EQUIPE DE TRABALHO: Valéria Magalhães Aguiar, Thiago de Araújo Mastrangelo, Camila Maistro Patreze, Clíssia Barboza da Silva, Maria Victoria Ramos Ballester.

Os insetos dípteros possuem relevância na entomologia forense (do grego éntomon: subdividido, adjetivo atribuído aos insetos que apresentam o corpo segmentado; e logos: estudo de algo) (Prestes, 2008). Essa ciência aplica o conhecimento técnico da biologia, ecologia e taxonomia de insetos e também outros artrópodes no esclarecimento de crimes ou procedimentos penais (Oliveira-Costa, 2011; Gadelha et al., 2015). Como os dípteros califorídeos normalmente se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição, são os primeiros insetos a serem atraídos pelo odor característico dos estágios iniciais de decomposição de um cadáver (Dadour et al., 2001; Azevedo et al., 2018) sendo assim empregados na investigação de homicídios, pois o padrão de sucessão e os estágios das formas imaturas encontradas próximas ou sobre um cadáver permitem a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) (Oliveira-Costa, 2011; Vasconcelos et al., 2013). Alguns fatores podem retardar a colonização dos insetos em cadáveres como: alterações no índice pluviométrico, diminuição de temperatura, e diferenças entre a latitude e altitude (Al-Khalifa, Mashaly, e Al-Qahtni 2020; Limsopatham et al. 2018). A entomologia forense pode ser utilizada também no âmbito da entomotoxicologia, onde pode-se verificar a aplicação de herbicidas, inseticidas, venenos e no controle de contaminações químicas não propositais, onde os insetos atuam como bioindicadores (Gusmão, 2008). Em cada área ecológica serão instaladas quatro armadilhas produzidas através de tubos de PVC, descritas segundo Mello et al., (2007). Na base da armadilha será colocada a isca atrativa, em duas armadilhas serão utilizadas como iscas 300 gramas de fígado fresco,

e nas outras duas, fígado com 48 horas de putrefação. Os tubos de PVC utilizados nas armadilhas terão 15 cm de diâmetro x 20 cm de altura pintada com tinta preta, fechado em uma das extremidades, com perfurações no tubo para a entrada dos dípteros. Na parte superior será colocado um pote de polietileno com a base previamente retirada onde foi adicionado um funil telado. Serão instalados ganchos de metal 19 na parte superior do tubo de PVC onde foram inseridas alças de metal para suporte da armadilha. Cada armadilha ficará exposta por 48 horas. Os dípteros coletados serão sacrificados com removedor de esmalte (a base de álcool etílico e acetato de etila) e transferidos para sacos de polietileno identificados com seu respectivo local, armadilha e data da coleta. Em seguida serão encaminhados ao Laboratório de Estudos de Dípteros (LED-UNIRIO) onde serão transferidos com sua respectiva identificação para placas de Petri forradas com papel absorvente, vedadas com filme de PVC e armazenadas em freezer 4 oC até realização da triagem. Os insetos serão identificados utilizando microscópio estereoscópico (Olympus SZX7®) seguindo as chaves taxonômicas de Mello (2003) e Kosmann et al., (2013a), alfinetados e armazenados na coleção entomológica do Museu Nacional e coleção do LED-UNIRIO. Dados meteorológicos dos dias de coleta serão adquiridos no Instituto Nacional de Meteorologia da estação meteorológica mais próxima das áreas de coleta.

O DNA será extraído de tecidos torácicos de espécimes preservados em etanol 95% pelo método de extração orgânica de Singh et al. (2011). Para alguns espécimes, a extração de DNA será realizada usando um Qiagen DNeasy blood and tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA extraído será quantificado usando um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Serão amplificados 5.189 pb de dados combinados de uma região mitocondrial (subunidade 1 do citocromo oxidase) e três genes nucleares (carbamoil fosfato sintetase, fator de alongamento um alfa e RNA ribossômico 28S) e as árvores filogenéticas serão reconstruídas utilizando máxima parcimônia, máxima verossimilhança e métodos Bayesianos.

Resultados esperados: (i) Acessar a diversidade morfológica e molecular de espécies de dípteros, avaliando parâmetros estruturais e índices faunísticos nas áreas ecológicas da Amazônia e da Mata Atlântica durante diferentes estações do ano; (ii) Comparar a abundância e diversidade das espécies atraídas por fígado fresco em diferentes estações do ano; (iii) Avaliar a influência dos fatores abióticos (temperatura; umidade relativa do ar média e precipitação total) na captura dos insetos nos ecossistemas durante as diferentes estações do ano; (iv) Identificar espécies que podem atuar como bioindicadores para rastreabilidade ambiental.

SUB-PROJETO 6. Sistema de atribuição geográfica de vestígios criminais com base em Machine Learning espacial e modelagem multisotópica

EQUIPE DE TRABALHO: Paulo José Duarte Neto, Luiz Antônio Martinelli, Plínio Barbosa de Camargo, Gabriela Bielefeld Nardoto, Tiago Alessandro Espínola Ferreira, Tatijana Stosic, Borko

Stosic, Antônio Samuel Alves da Silva, Jader da Silva Jale, Kleber Napoleão, Fabio José Viana Costa, Jorge Marcelo de Freitas.

Espera-se que um modelo isotópico de atribuição de origem geográfica eficiente seja aquele que apresenta uma estrutura baseada em (I) um banco de dados geograficamente abrangente e estruturado, (II) que tenha como base de entrada informações que abranjam variações locais, globais e de dependência espacial, (III) que apresente *isoscapes* construídas tanto em técnicas de *machine learning* (ML) de maior acurácia e que incorporem a autocorrelação espacial dos dados; e (IV) que permita, de maneira adequada e eficiente, a modelagem da atribuição geográfica a partir de um ou mais isótopos simultaneamente de maneira generalizada e que incorpore possíveis correlações entre as distribuições marginais. Desta forma, o presente subprojeto tem como principal objetivo a construção de um sistema eficiente de atribuição geográfica de amostras de solo, material vegetal e alimentos para o território brasileiro com base nessas premissas, e que possa ser utilizado efetivamente por órgãos competentes. Para isso, o projeto contará com a longa experiência do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), mais precisamente, com a equipe do Prof. Dr. Martinelli (Laboratório Ecologia Isotópica) na coleta e análise de amostras para geração de dados isotópicos, em colaboração com o grupo de pesquisadores que fazem parte do corpo docente do Programa em Biometria e Estatística Aplicada (PPGBEA) da UFRPE. Para se atingir o objetivo geral, o projeto será dividido em quatro etapas: I - Estruturação de um banco de dados isotópicos; II - Construção de matrizes de *features* gerais e espaciais integradas; III- *Machine Learning* no desenvolvimento de *Isoscapes* para o território brasileiro, e IV - Modelos matemáticos de atribuições de origem geográfica.

Resultados esperados: O principal produto da presente proposta será um modelo integrado para atribuição de geográfica de amostras da Amazônia e da Mata Atlântica com base em técnicas de ML que leve em consideração autocorrelação espacial e permita a modelagem multi-isotópica para rastreabilidade agroambiental. Os dados também serão integrados àqueles gerados pelos outros subprojetos para retroalimentação dos modelos de ML a fim de melhorar a acurácia na predição de fatores agroambientais para rastreabilidade.

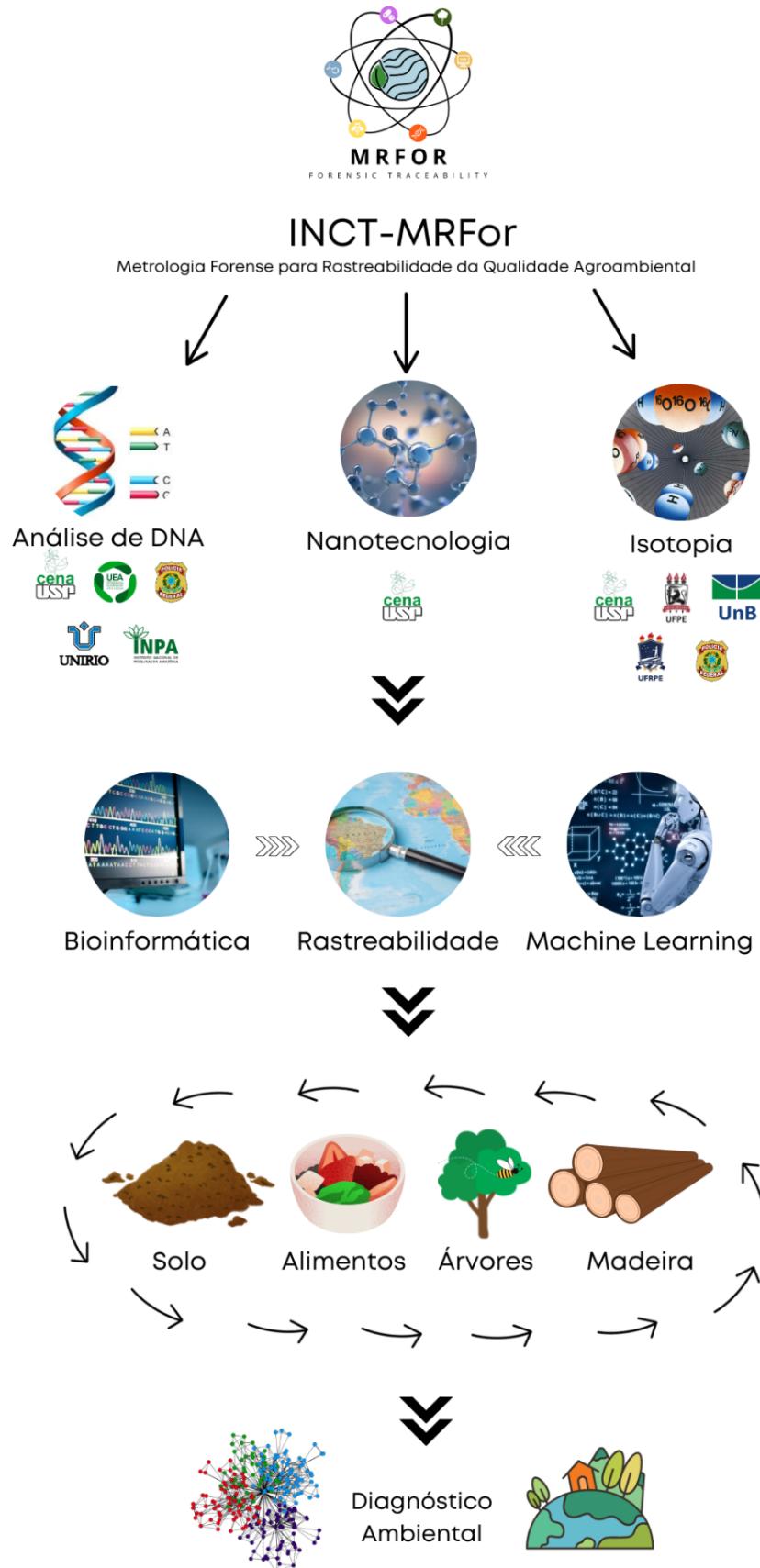


Figura 1. Panorama geral de análises, instituições envolvidas e resultados esperados.

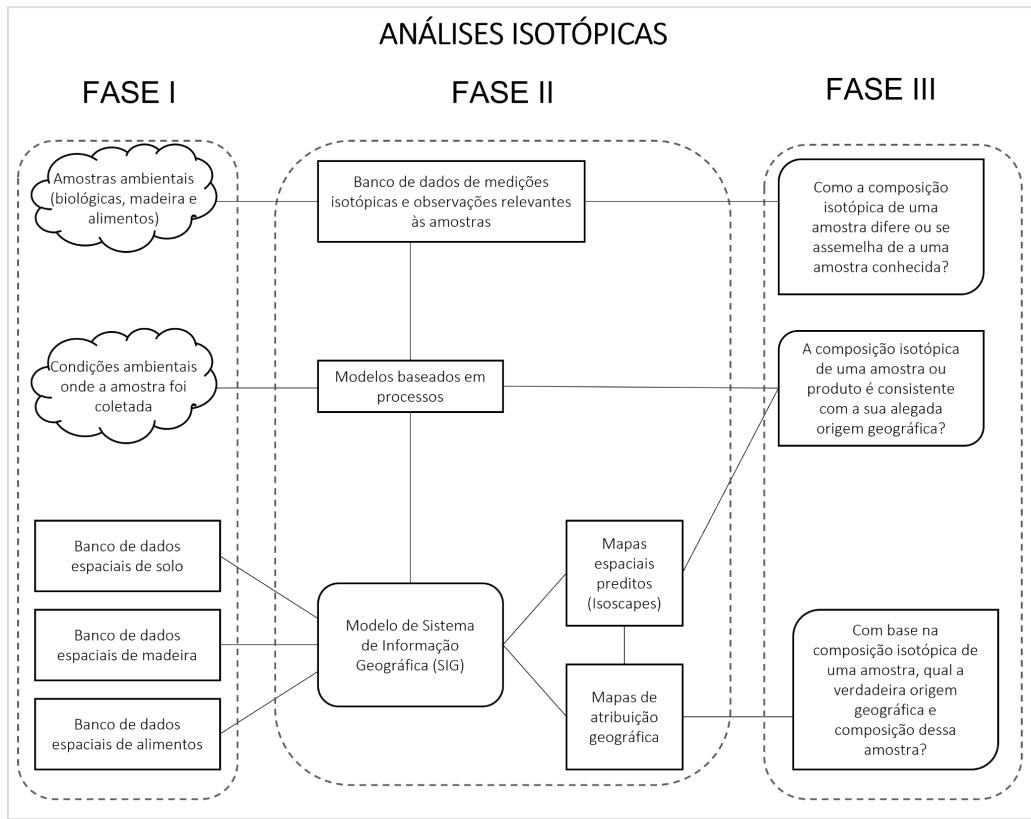


Figura 2. Framework das diferentes análises isotópicas e etapas que serão desenvolvidas ao longo do projeto. Adaptado de Ehleringer et al. (2010).

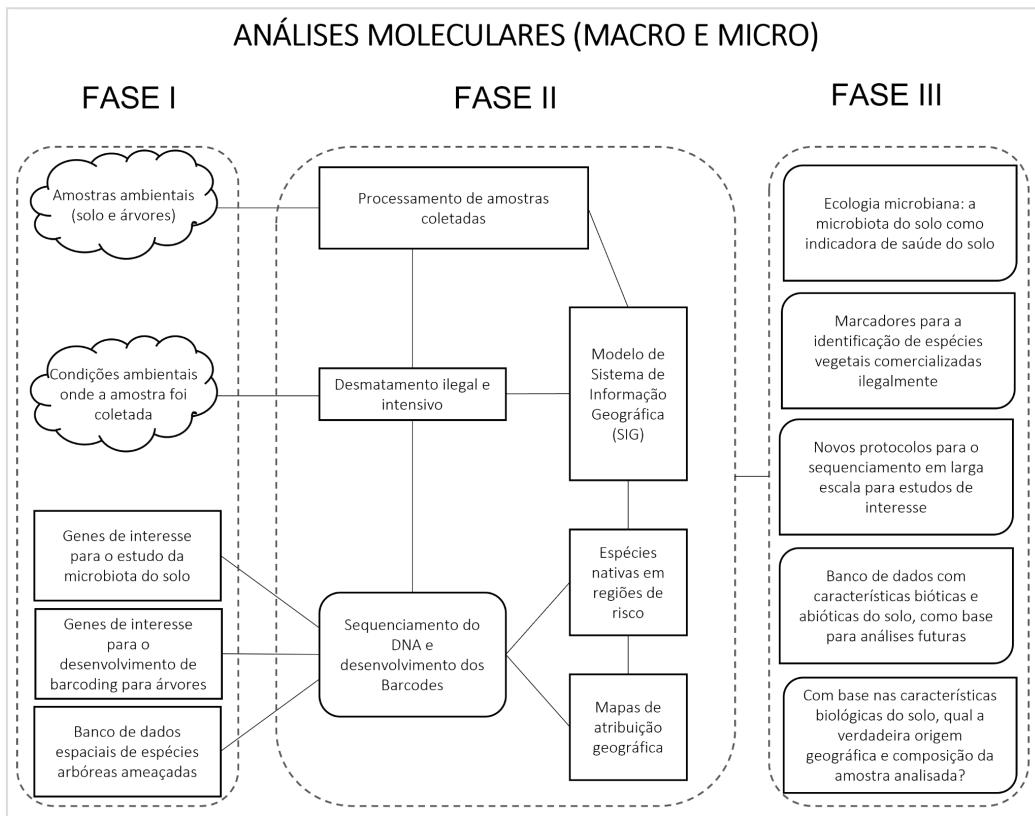


Figura 3. Framework das diferentes análises moleculares e etapas que serão desenvolvidas ao longo do projeto. Adaptado de Ehleringer et al. (2010).

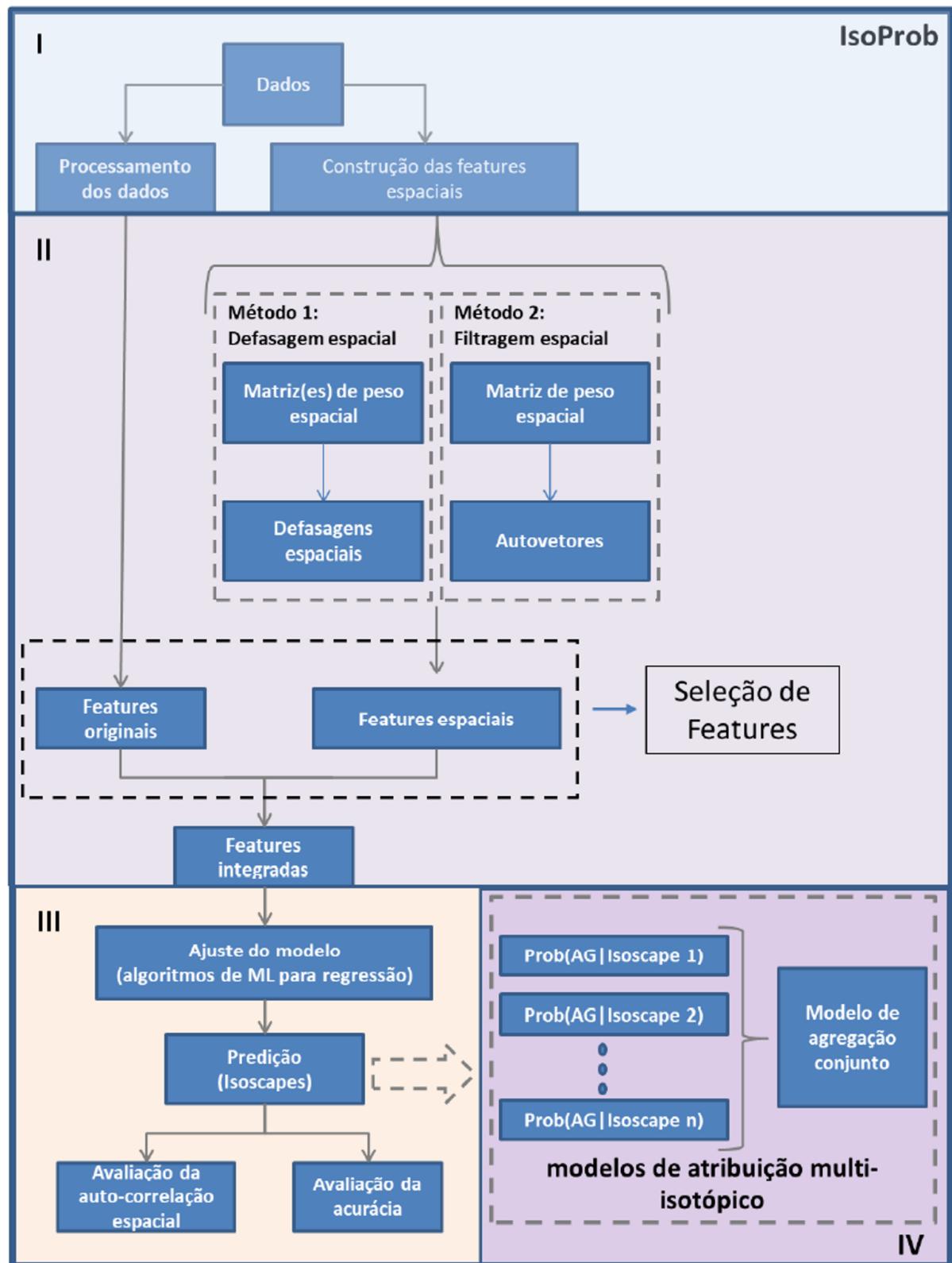


Figura 4. Framework do sistema de atribuição geográfica (AG) proposto (IsoProb), destacando as diferentes etapas de desenvolvimento. Adaptado de Liu et al. (2022).

k. Resultados científicos e tecnológicos já obtidos pelas instituições que compõem o INCT, na temática da proposta:

- Martinelli, L. A.; Nardoto, G. B.; Soltangheisi, A.; Reis, C. R. G.; Abdalla-Filho, A. L.; et al. Determining ecosystem functioning in Brazilian biomes through foliar carbon and nitrogen concentrations and stable isotope ratios. *Biogeochemistry* 154 (2), 405-423, 2020. Acesso ao banco de dados: <https://doi.org/10.17632/38npddpnts.1>.
- Diniz-Reis et al. SIA-BRA: A database of animal stable carbon and nitrogen isotope ratios of Brazil. *Global Ecology and Biogeography* 31: 601-611, 2022. Acesso ao banco de dados: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4609306>.
- Nardoto, G. B.; da Silva, R. J.; Schor, T.; Garavello, M. E. P. E.; da Silva, M. R. F.; Martinelli, L. A. Mapping carbon and nitrogen isotopic composition of fingernails to demonstrate a rural–urban nutrition transition in the Center-West, Northeast, and Amazon regions of Brazil. *American Journal of Physical Anthropology* 172 (4), 650-663, 2020. <http://dx.doi.org/10.17632/g7rhtwnn8m.1>.
- Sena-Souza, J. P.; Houlton, B. Z.; Martinelli, L. A.; Bielefeld Nardoto, G. Reconstructing continental-scale variation in soil $\delta^{15}\text{N}$: a machine learning approach in South America. *Ecosphere* 11 (8), e03223, 2020. Acesso aos dados: <http://dx.doi.org/10.17632/rhhp9x6bcd.1>
- Fernandes, E. A. N.; Sarriés, G. A.; Mazola, Y. T.; Lima, R. C.; Furlan, G. N.; Bacchi, M. A. Machine learning to support geographical origin traceability of Coffea Arabica. *Advances in Artificial Intelligence and Machine Learning*, v. 02, p. 273-287, 2022.
- Fernandes, E. A. N.; Mazola, Y. T.; Sarriés, G. A.; Bacchi, M. A.; Bode, P.; Gonzaga, C. L.; Sarries, S. R. V. Discriminating Beef Producing Countries by Multi-Element Analysis and Machine Learning. *Advances in Artificial Intelligence and Machine Learning*, v. 01, p. 01-11, 2021.
- Fernandes, E. A. N.; Sarriés, G. A.; Bacchi, M. A.; Mazola, Y. T.; Gonzaga, C. L.; Sarriés, Silvana R.V. Trace elements and machine learning for Brazilian beef traceability. *FOOD CHEMISTRY*, v. 333, p. 127462, 2020.
- Turra, C.; Fernandes, E. A. N.; Bacchi, M. A.; Sarriés, G. A.; Reyes, A. E. L. Uptake of rare earth elements by citrus plants from phosphate fertilizers. *PLANT AND SOIL*, v. 437, p. 291, 2019.
- Sena'souza, J. P.; Houlton, B. Z.; Martinelli, L. A.; Bielefeld Nardoto, G. Reconstructing continental-scale variation in soil $\delta^{15}\text{N}$: a machine learning approach in South America. *Ecosphere*, v. 11, p. e2232, 2020.
- Carneiro, L. T.; Azevedo, W. T. A.; Aguiar, V. M.; Couri, M. S. The Nocturnal Oviposition Behavior of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Brazil and Its Forensic Implications. *Journal Of Medical Entomology*, v. 58, p. 558-566, 2020.
- Salazar-Souza, M.; Couri, M. S.; Aguiar, V. M. Chronology of the Intrapuparial Development of the Blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): Application in Forensic Entomology. *Journal Of Medical Entomology*, v. xx, p. 1-8, 2018
- Salazar'Souza, M.; Alcantara Azevedo, W. T.; Couri, M. S.; Aguiar, V. M. Diets of animal origin and their influence on the development of the immatures of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *Austral Entomology*, v. 58, p. 638-645, 2018.
- Salazar'Souza, M.; Couri, M. S.; Aguiar, V. M. Post-embryonic development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) in swine and bovine tissues in South America: implications for forensic entomology. *Austral Entomology*, v. 58, p. 329-335, 2017.
- Costa, F.J.V., Hobson, K.A., Wunder, M.B. et al. Linking environmental indicators to blood, feather and claw $\delta^{18}\text{O}$ in the Saffron Finch (*Sicalis flaveola*) in the central Brazilian savannas. *J Ornithol* 163, 223–234 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10336-021-01939-0>

Diniz-Reis, Thaís Rovere, et al. "SIA-BRA: A database of animal stable carbon and nitrogen isotope ratios of Brazil." *Global Ecology and Biogeography* 31.4 (2022): 611-620.

Mariano, Eduardo, et al. "LT-Brazil: A database of leaf traits across biomes and vegetation types in Brazil." *Global Ecology and Biogeography* 30.11 (2021): 2136-2146.

Nardoto, Gabriela B., et al. "Mapping carbon and nitrogen isotopic composition of fingernails to demonstrate a rural–urban nutrition transition in the Center-West, Northeast, and Amazon regions of Brazil." *American Journal of Physical Anthropology* 172.4 (2020): 650-663.

I. Cronograma de execução:

Obs.: As propostas a serem apoiadas pela presente Chamada deverão ter seu prazo máximo de execução estabelecido em 60 (sessenta) meses (5 anos).

Plano de atividades	Ano / Semestre									
	1		2		3		4		5	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Sub-projeto 1: Técnicas de análise isotópica e nuclear para agricultura e meio ambiente										
Estabelecimento de padrões vegetais para certificação e rastreabilidade geográfica.	X	X	X	X						
Modelagem de sistemas de produção agrícola para autenticidade agroalimentar.			X	X	X	X				
Desenvolvimento de modelo preditivo relacionado à dinâmica de ecossistemas.							X	X	X	X
Sub-projeto 2: Nano Fingerprinting – Uma nova ferramenta para rastreabilidade e autenticidade na agricultura e meio ambiente										
Formulação de padrões de <i>Nano fingerprinting</i> para solos, plantas e alimentos.	X	X	X							
Testes de codificação e leituras por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).			X	X	X	X				
Avaliação das novas formulações em organismos modelo.							X	X	X	X
Sub-projeto 3: Rastreabilidade do destino da madeira oriunda de extração ilegal de madeira em floresta tropical úmida, aplicando métodos isotópicos forenses										
Construção das isoscapes.	X	X	X							
Elaboração de mapas compostos por isolinhas para determinação em matrizes de madeiras.			X	X	X					
Atribuição de origem através de métodos estatístico-espaciais.					X	X	X	X	X	X
Sub-projeto 4: Biodiversidade, rastreabilidade e conservação de solos e de florestas nativas tropicais										
Desenvolvimento de barcodes de DNA para as principais espécies vegetais com alto risco de desmatamento ilegal.	X	X	X	X	X					

Estudo das áreas designadas com exploração madereira ilegal.				X	X	X	X			
Desenvolvimento de protocolos para sequências de DNA em larga escala para complementar SP 1, 2 e 3.					X	X	X	X	X	
Sub-projeto 5: Análise da diversidade de dípteros baseados em taxonomia morfológica e molecular em áreas agrícolas e florestais										
Instalação de experimentos e coleta de dípteros. Avaliação de parâmetros estruturais e índices faunísticos.	X	X	X	X						
Comparação da abundância e diversidade de espécies. Avaliação da influência de fatores abióticos.			X	X	X					
Seleção de espécies a ser utilizadas como bioindicadores forenses.						X	X	X	X	X
Sub-projeto 6: Sistema de atribuição geográfica de vestígios criminais com base em Machine Learning espacial e modelagem multisolítica										
Modelagem isotópica para rastreabilidade agroambiental.	X	X	X	X						
Integração de dados para retroalimentação a Machine Learning.			X	X	X	X	X			
Modelo integrado para atribuição geográfica de amostras de madeira com base em Machine Learning.							X	X	X	X

m. Disponibilidade das principais Infraestruturas e de apoio institucional:

O Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) fornece 4 Canais Multi-Usuário para realização total das atividades de pesquisa relacionadas ao projeto proposto. São eles:

- Central Multusuário de Análises Químicas (CMAQ)
- Central Multusuário de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (CM-IRMS)
- Central de Equipamentos Multiusuários de Análises Biológicas e Bioquímicas (CMABBq)
- Metrologia e Qualidade na Agropecuária (MQA)

Equipamentos Multiusuário disponíveis no Centro de Energia Nuclear na Agricultura: Sistema com plataforma para microdissecção por captura a laser aplicada em estudos de biologia celular e molecular; Dual-laser trace gas monitor; Micro X-Ray fluorescence system; Cromatógrafo a líquido de alta eficiência; Espectrometria de emissão óptica para LIBS; Espectrômetro de massa Delta V Advantage; Sistema de imagem SeedReporter Camera Spectral & Colour; Sistema de imagem VideoMeterLab; Multifocus Digital Radiography System; Quantstudio 5 Real-Time PCR System (qPCR); Espectrômetro de massas de alta resolução para análises de proteômicas e metabolômicas.

n. Modelo de gestão e governança para o INCT:

As ações focais do INCT-MRFor são voltadas à:

Pesquisa. O INCT-MRFor possui seis sub-projetos, que envolverão o desenvolvimento e aplicação de: (a) técnicas analíticas isotópicas e nucleares; (b) nanofingerprinting para rastreabilidade e autenticidade na agricultura e cadeias de produção de madeira; (c) rastreabilidade do destino da madeira derivada da extração ilegal em floresta tropical, aplicando métodos isotópicos forenses; (d)

DNA barcoding na biodiversidade, rastreabilidade e estudos de conservação de florestas tropicais nativas; (e) rastrear a degradação dos ecossistemas terrestres e da biodiversidade associada como base para uma melhor conservação, restauração e remediação e (f) construir de um sistema de atribuição geográfica de amostras de vestígios criminais eficiente para o território brasileiro com base nessas premissas, e que possa ser utilizado efetivamente pelos órgãos de segurança nacionais e estaduais.

Formação de recursos humanos. Através do envolvimento de alunos de graduação e pós-graduação no INCT-MRFor serão treinadas pessoas capazes de atuar em diferentes áreas da sociedade, englobando aspectos técnicos, de gestão e de tomada de decisão relacionadas à rastreabilidade agroambiental.

Transferência de conhecimento para a sociedade. Com a produção de teses, dissertações e artigos científicos os resultados serão disponibilizados para a sociedade. Também, visando a democratização do conhecimento científico, serão produzidos materiais didáticos, audiovisuais, organizadas palestras, eventos e cursos que beneficiem a sociedade. Além disso, os resultados obtidos poderão subsidiar a análise de especialistas de diversos setores da sociedade.

Comitê gestor

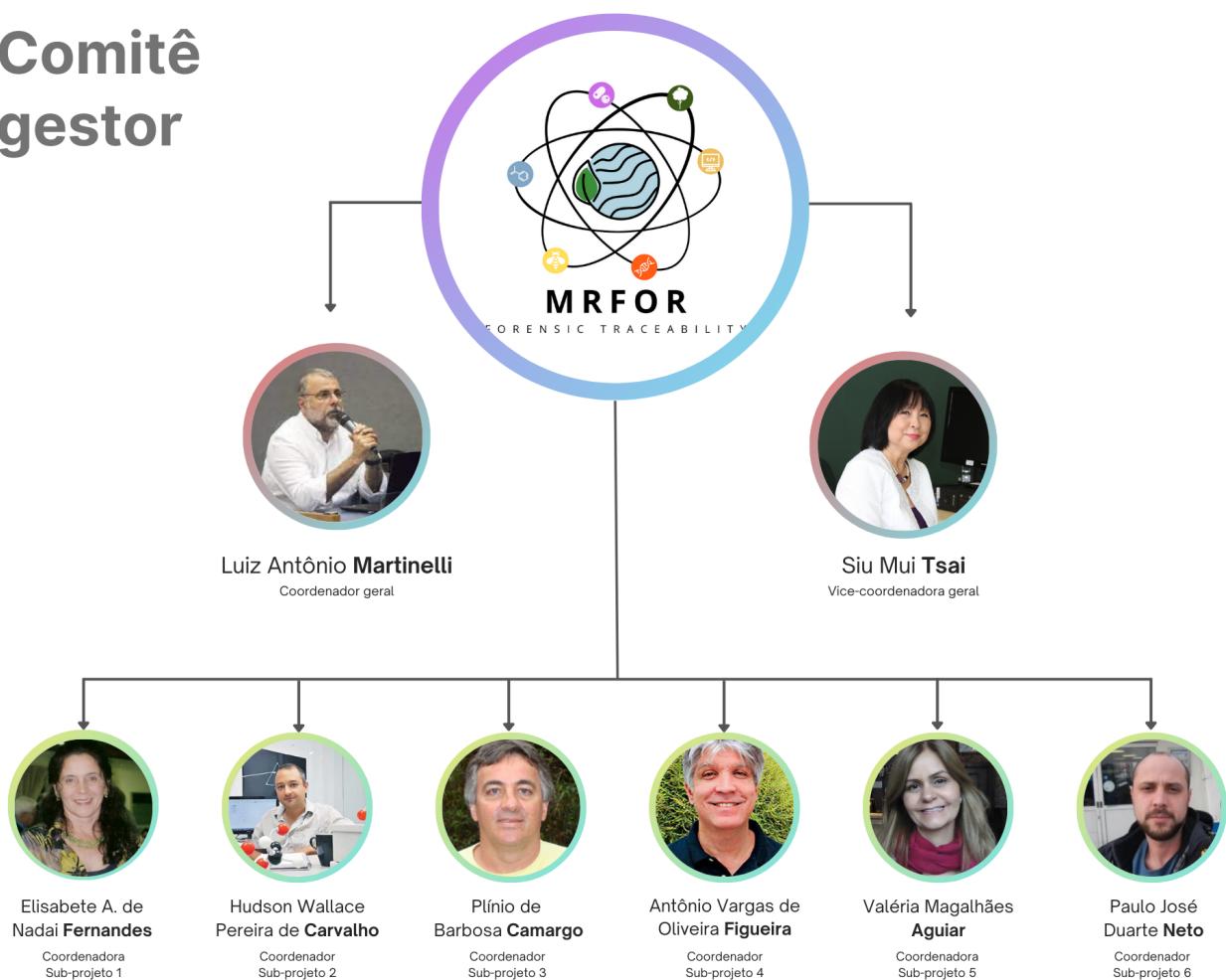


Figura 5. Organograma definindo o comitê gestor do INCT-MRFor, com os coordenadores gerais e de cada um dos sub-projetos.

Comitê gestor

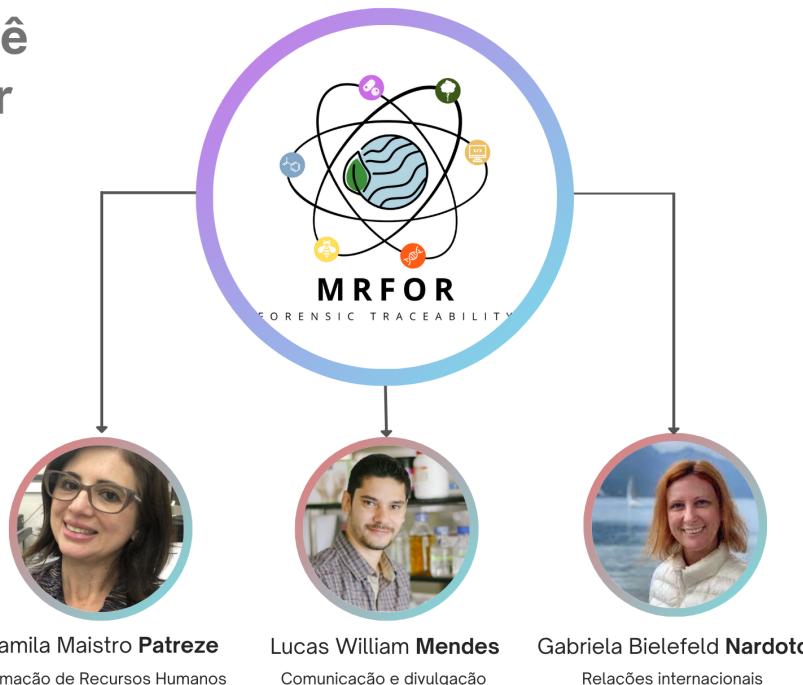


Figura 6. Organograma definindo as funções de formação de RH, de divulgação e de relações internacionais do INCT-MRFOR.

Grupos de pesquisa

Pesquisadores associados a cada um dos sub-projetos

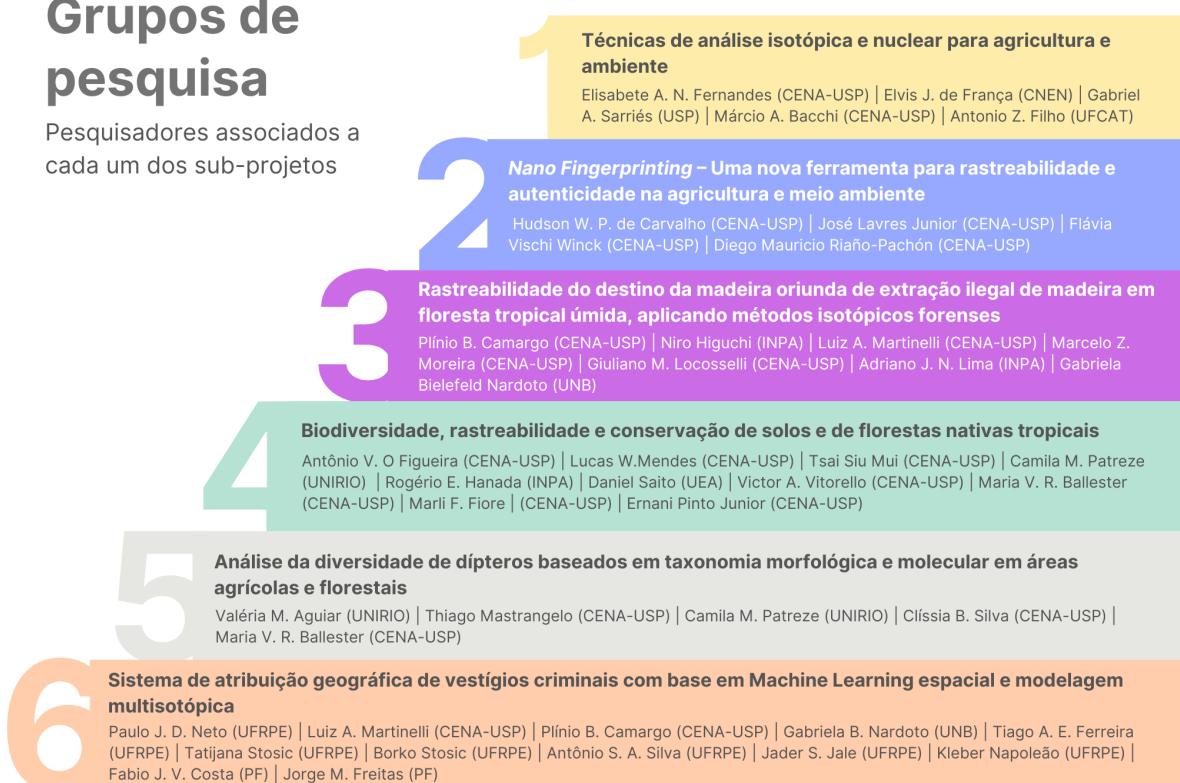


Figura 7. Definições e pesquisadores associados a cada um dos sub-projetos vinculados ao INCT-MRFOR.

o. Áreas do conhecimento:

Ecologia isotópica; Isótopos estáveis em Ciências Forenses; Biologia Molecular; Entomologia forense; Instrumentação nuclear; Modelagem estatística; Taxonomia de fungos; Microbiologia oral; Ecologia microbiana; Nanomateriais; Raio-X; Ecologia florestal; Entomologia agrícola; Análise ambiental; Geoprocessamento; Avaliação da qualidade ambiental; Estatística experimental; Ciência de dados; Química; Fertilizantes; Nutrição de plantas; Fertilidade do solo; Manejo florestal; Fisiologia vegetal; Ecologia molecular de cianobactérias; Bioquímica de plantas.

p. Setores de Atividade Econômica:

Setores secundário e terciário, através da prospecção de serviços e produtos para rastreabilidade de evidências forenses.

q. Parcerias e articulações estabelecidas com Empresas, Fundação de Amparo à Pesquisa Estadual ou Organizações Públicas e/ou Sociais para a execução da proposta:

A parceria e integração entre o meio acadêmico e a Polícia Federal serão determinantes para as aplicações práticas das metodologias de rastreamento a serem desenvolvidas no âmbito da presente proposta. Com a proposta de inovação do conhecimento corrente e rompimento de alguns paradigmas metodológicos existentes, o trabalho em conjunto das instituições acadêmicas aqui envolvidas com o Instituto Nacional de Criminalística (INC) da Polícia Federal irá favorecer a criação de alternativas tecnológicas para a solução dos problemas cotidianos enfrentados pela Polícia Federal, criando um ambiente de transformação e diminuindo as distâncias ao tornar possíveis novas aplicações práticas para os métodos aqui desenvolvidos.

Esta parceria irá contar com o Laboratório Nacional de Isótopos Forenses com sede no Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, Brasília, DF, criado em 2019, com uma estrutura diferente dos demais setores periciais, cujo ambiente tem possibilitado maior flexibilidade para desenvolvimentos, e, ao mesmo tempo, aplicações transversais nas mais diversas áreas periciais. O laboratório conta com equipamentos de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (IRMS), fluorescência de raio-x, cromatografia líquida e gasosa, dentre outros. Esta interface conta com a interlocução da Rede Nacional de Isótopos Forenses, a RENIF, que é uma associação científica, fundada com o intuito de contribuir para a aplicação da metodologia isotópica no âmbito das ciências forenses no país. A RENIF tem como missão fomentar o desenvolvimento, o intercâmbio, a difusão e a aplicação de conhecimentos da ciência isotópica na área forense, visando a produção qualificada da prova científica para fins de investigações criminais e procedimentos jurisdicionais penais e cíveis. Para isso, a RENIF vem congregando pesquisadores, peritos criminais e demais profissionais, facilitando o intercâmbio de informações sobre métodos que usam isótopos forenses.

O coordenador da presente proposta, Dr Luiz Antonio Martinelli foi um dos pioneiros nesta iniciativa entre diversas instituições de pesquisa (UnB, CENA-USP, INPA e UFRPE) e a Polícia Federal, dentro de uma perspectiva concreta em âmbito nacional de congregação de usuários, consolidação de técnicas e sistematização de bancos de dados voltados ao uso de isótopos estáveis no combate ao crime. Essa parceria teve início com o desenvolvimento de um projeto aprovado no edital CAPES - Pró-Forense 2014, que por sua vez, teve desdobramentos práticos fundamentais como a criação do LANIF na Polícia Federal e da RENIF, e mais recentemente com a aprovação do PROCAD – CAPES 2020 - Rastreamento de origem e georreferenciamento de vestígios criminais com base em traçadores isotópicos e elementares, coordenado pelo Dr. Martinelli, uma parceria entre CENA e Polícia Federal. Diante deste contexto, espera-se com este INCT, a consolidação de novas técnicas de rastreabilidade agroambiental que serão fundamentais para se ter uma base sólida de conhecimento coletivo com o

propósito de aprimorar os métodos de detecção e redução de crimes no país, que poderá ser usado no cotidiano tanto no âmbito federal como estaduais.

r. Grau de inovação e potencial de impacto dos resultados sob o ponto de vista científico, tecnológico, econômico e socioambiental no contexto nacional e internacional:

Este projeto irá subsidiar metodologias de análises forenses que poderão ser utilizadas no âmbito federal e privado. Ainda, os resultados poderão fornecer informações úteis para investigações e resoluções de crimes ambientais e comércio ilegal de produtos biológicos.

s. Plano de Divulgação científica:

Os resultados serão publicados em revistas de impacto internacional para divulgação à comunidade científica. Para a divulgação à sociedade, serão feitas publicações online, vídeos abordando os resultados obtidos e a realização de eventos de extensão e workshops para o ensino em diferentes níveis (fundamental, médio, tecnológico e superior), tais como o “CENA na praça” e a “Feira de Profissões da USP”.

t. Recursos (Custeio, Capital e Bolsas):

Material Permanente		
Item	Descrição	Valor (R\$)
1. ULTRAFREEZER - 80°C SERIE TSX MODELO TSX60086D - 816 LITROS	Armazenamento de amostras biológicas sensíveis à degradação térmica, como células e microrganismos	215.170,00
2. ULTRAFREEZER -80°C SERIE FDE MODELO FDE6 0086LD - 816 LITROS	Armazenamento de amostras biológicas sensíveis à degradação térmica, como células e microrganismos	203.759,00
3. Computador	Processador Intel Core i3-10100F - Placa-Mãe Gigabyte B460M - Memória DDR4 4GB - HD 1TB - Placa de Vídeo 1GB - Fonte 500W - Gabinete - Monitor LG 19.5' Análise de dados, incluindo mineração, anotação, análise estatística e interpretação biológica e modelagem computacional	7.088,00
4. NANODROP 8000 com Laptop	Espectrofotômetro para quantificação de ácidos nucléicos, proteínas, células, etc.	98.883,60
5. QUBIT FLEX QUANTITATION KIT KIT	Fluorímetro para quantificação precisa de DNA e RNA	29.914,83

6. KINGFISHER APEX 96 DW HEAD EA	Extrator de DNA automatizado, utilizado para diferentes tipos de amostras biológicas, reduzindo o tempo de trabalho, risco de erros e aumentando a eficiência, reprodutibilidade e confiança nos resultados.	371.312,81
7. ABI 3500 (8 capilares)	Plataforma de eletroforese capilar para sequenciamento automático e análise multiplex de fragmentos de DNA.	775.720,00
8. Bioinformatics server	Servidor utilizará uma opção de virtualização, que permitirá compartimentaliza-lo em uma parte como servidor que integrará nosso HPC do CENA/USP e outro servidor virtual que hospedará os bancos de dados desenvolvidos em todas as atividades do projeto.	528.000,00
9. Storage 96 Terabytes	Os dados de sequenciamento gerados (raw e FASTQ) serão processados no servidor de bioinformática (acima), mas devem ser armazenados a médio prazo antes de serem publicados, uma vez publicados os dados serão depositados em repositórios públicos. Para isso, precisamos de um servidor de armazenamento com pelo menos 96 TB de espaço.	203.500,00
10. Nanopore	Sequenciador portátil de DNA e RNA em tempo real, capaz de gerar sequências longas	72.684,99
11. INNO microplate reader, brand Ltek.	Detecção de compostos marcados com pu a partir de subprodutos de reações químicas para quantificação de compostos inorgânicos e orgânicos como fontes de N e P, proteínas, carboidratos, entre outros	59.125,00
12. LN2 storage and transport container, model LD25, Worthington brand	Transporte de amostras biológicas em temperaturas ultra baixas inibindo reações de degradação de material biológico	26.125,00
13. Lyophilizer Alpha model 2-4 LSC Basic, brand Christ.	Preparação de amostra para tratamento de extração de moléculas através de remoção de água por sublimação de ponto crítico	121.990,00
14. Benchtop refrigerated centrifuge, model Routine 380R, Hettich brand	Coleta de materiais a uma temperatura que preserva as propriedades biológicas dos materiais	66.220,00
15. Amplyus brand miniPCR" mini16 thermocycler	Amplificação e detecção de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR)	6.930,00
16. Model Q125 Sonicator, QSonica brand	Sonicador compacto e fácil de usar; Processa de 200uL a 50mL de amostra	29.645,00

17. RAININ XLS pipettes models: manual single-channel, electronic single-channel and manual multi-channel	Pipetas para biologia molecular	8.580,00
18. Compatible drone to attach the LGR-ICOS" UAV-based analyzer	Drone para registro de imagens aéreas das áreas de coleta e adaptação do LGR-ICOS.	82.500,00
19. Homogeneizador Modelo Bead Ruptor 96, marca Omni	Utilizado para moagem criogênica, placas de 96 amostras, moagem com beads em microtubos e tubos com tampa de rosca; Processa de 25 ul até 50 mL de amostra; Tempo de operação: 1s a 99 min; Velocidade de 1 a 30 Hz; Alto rendimento: processa até 384 amostras por ciclo.	379.903,00
TOTAL (R\$)		3.204.541,23

Material de Consumo		
Item	Descrição	Valor (R\$)
1. Materiais descartáveis (Plásticos)	Ponteiras, racks para ponteiras, micro-tubos para microcentrifuga, placas descartáveis, tubos falcon, placas de PCR, vasos plásticos, etc.	300.000,00
2. Reagentes químicos e de biologia molecular	Reagentes para PCR, qPCR, marcadores moleculares, kits de extração de DNA e RNA, kits de purificação, Trizol, Isopropanol, Etanol, Dynabeads mRNA purification Kit, GoTaq@2Steo RT qPCR system	480.000,00
TOTAL (R\$)		780.000,00

Transporte		
Item	Descrição	Valor (R\$)
1. Passagens aéreas	Passagens aéreas para coleta de amostras e reuniões científicas. Total de 16 passagens por ano de projeto. 16 passagens x 5 anos = 80 passagens de R\$2.000,00	160.000,00
TOTAL (R\$)		160.000,00

Diárias

Item	Descrição	Valor (R\$)
1. Diárias	Diárias para coleta de amostras e reuniões científicas. Total de 75 diárias por ano do projeto. 75 diárias x 5 anos = 375 diárias de R\$ 320,00	120.000,00
TOTAL (R\$)		120.000,00

Serviço de Terceiros		
Item	Descrição	Valor (R\$)
1. Análise química do solo	Análise química de amostras de solo, no valor de R\$ 45,00 reais por amostra	60.000,00
2. Análise Isotópica de amostras	Análise isotópica de amostras no valor unitário de R\$ 88,00 por amostra	180.000,00
3. Sequenciamento de DNA	Sequenciamento de DNA amplicon e metagenômica, no valor unitário de R\$ 200,00 para amplicon e R\$ 1.200,00 para metagenoma, por amostra	360.000,00
TOTAL (R\$)		600.000,00

Bolsas		
Item	Descrição	Valor (R\$)
1. Bolsa de Pós Doutorado	5 bolsas de pós doutorado por 60 meses no valor de R\$ 4.100,00	1.230.000,00
2. Bolsa DTI-II	5 bolsas de 60 meses no valor de R\$ 3.000,00 mensais	900.000,00
TOTAL (R\$)		2.130.000,00

u. Quadro Geral de Orçamento:

Item	Valores em Reais (R\$)
Material Permanente	3.204.541,23
Material de Consumo	780.000,00
Transporte	160.000,00
Diárias	120.000,00

Serviço de Terceiros	600.000,00
Bolsas	2.130.000,00
TOTAL (R\$)	6.994.541,23

REFERÊNCIAS

Al-Khalifa, M. S.; Mashaly, A. M.; Al-Qahtani, A. H. (2020). Insect Species Colonized Indoor and Outdoor Human Corpses in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of King Saud University - Science*, 32(3): 1812–17.

Alves-Pinto, H. N.; Latawiec, A. E.; Strassburg, B. B. N.; et al. (2017). Reconciling rural development and ecological restoration: Strategies and policy recommendations for the Brazilian Atlantic Forest. *Land Use Policy* 60, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2016.08.004>.

Azevedo, W. T. D. A.; Carvalho, R. P. D.; Figueiredo, A. L. D.; et al (2018). Calliphoridae (Diptera) Associated With Rattus rattus Carcasses in the Tijuca National Park, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 55(4), 915-922.

Chesson, L.; Barnette, J.; Bowen, G.; et al. (2018). Applying the principles of isotope analysis in plant and animal ecology to forensic science in the Americas. *Oecologia*, 187. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4188-1>.

Costa, F. J. V.; Ribeiro, R. E.; De Souza, C.A.; et al (2018). Espécies de Aves Traficadas no Brasil. *Journal of Social, Technological and Environmental Science*, 7, 324–346. <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2018v7i2.p324-346>.

Dadour, I. R.; Cook, D. F.; Fissioli, J. N.; et al (2001). Forensic entomology: application, education and research in Western Australia. *Forensic Science International*, 120 (1-2), 48-52.

Ehleringer, J. R. A. H.; Thompson, D.; Podlesak, G. J.; et al (2010). A framework for the incorporation of isotopes and isoscapes in geospatial forensic investigations, p. 357-387. In J. West, G.J. Bowen, T.E. Dawson, and K. Tu (eds.), *Isoscapes: understanding movement, pattern, and process on Earth through isotope mapping*. Springer Verlag, New York.

França, Elvis J.; Fernandes, E. A. N.; Bacchi, M. A.; et al. (2002). Pathway of rare-earth elements in a Brazilian forestry fragment. *Journal of alloys and compounds*, 344.1-2, 21-26.

Gadelha, B. Q.; Ribeiro, A. C.; Aguiar, V. M.; et al. (2015). Edge effects on the blowfly fauna (Diptera, Calliphoridae) of the Tijuca National Park, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75, 999-1007.

Gusmão, J. B. (2008). *Estudo Preliminar da Sucessão Entomológica (com Ênfase na Ordem Diptera) em Diferentes Cadáveres de Animais Selvagens na Serra da Estrela* [dissertation]. Lisbon: Univ. of Lisbon.

Javan, G.T.; Finley, S.J.; Can, I.; et al. (2016). Human Thanatatomicbiome Succession and Time Since Death. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep29598>.

Kosmann, C.; Prestes, A. C.; Tepedino, K. P.; et al. (2017). Lista das espécies de Calliphoridae (Diptera, Oestroidea) do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 107 (supl).

Liu, X.; Kounadi, O.; Zurita-Milla, R. (2022). Incorporating Spatial Autocorrelation in Machine Learning Models Using Spatial Lag and Eigenvector Spatial Filtering Features. *ISPRS International Journal of Geo-Information*, 11, 242. <https://doi.org/10.3390/ijgi11040242>.

Matielo, C.B.D.; Lemos, R.P.M.; Sarzi, D.S.; et al. (2019). Whole Plastome Sequences of Two Drug-Type Cannabis: Insights Into the Use of Plastid in Forensic Analyses. *Journal of Forensic Sciences*, 65, 259–265. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14155>.

Mello, R. D. (2003). Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomología y Vectores*, 10(2), 255-268.

Mello, R. D. S.; Queiroz, M.; Aguiar-Coelho, V. M. (2007). Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*, 97, 481-485.

Miranda, N.; Júnior, E.; Collevatti, R. (2014). A Genética contra os crimes ambientais: identificação de madeira ilegal provenientes de unidades de conservação utilizando marcador molecular. *Genética na Escola*. 9 (2), 124–135. <https://doi.org/10.55838/1980-3540.ge.2014.183>.

Odon, T.I. (2018). Segurança pública e análise econômica do crime. *Revista de Informação Legislativa*. RIL 55, 33–61.

Oliveira-Costa, J.; et al (2011). Dípteros de interesse forense no Brasil. In: Oliveira-Costa, J. *Entomologia forense: Quando os insetos são os vestígios*. 3. ed. Campinas, SP: Millennium. p.87-130.

Prestes, M. E. B. (2008). Definição e classificação de insetos por René-Antoine Ferchault de Réaumur. *Filosofia e História da Biologia*, 3(1), 263-284.

Rezende, C. L.; Scaranoab, F.R.; Assad, E. D.; et al. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 16, n. 4, p. 208–214, 2018.

Tommasi, F.; Thomas, P. J.; Pagano, G.; et al. (2021). Review of rare earth elements as fertilizers and feed additives: a knowledge gap analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(4), 531-540.

Vasconcelos, S. D.; Cruz, T. M.; Salgado, R. L.; et al. (2013). Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rain Forest fragment in Brazil: notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. *Journal of Insect Science*, 13(1), 145.

v. Declaração: