



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DIRETORIA DE PESQUISA

RELATÓRIO TÉCNICO - CIENTÍFICO FINAL

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PIBIC/CNPq, PIBIC/CNPq-AF, PIBITI, PIBIC/UFPA, PIBIC/UFPA-AF, PIBIC/UFPA-INTERIOR, e PIBIC/UFPA-EBTT, PIBIC/UFPA-PcD, PRODOUTOR, PRODOUTOR RENOVAÇÃO, PIVIC, FAPESPA, PIBIC-EM.

PERÍODO: SETEMBRO/2021 a AGOSTO/2022

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Nome do Orientador: PERICLES SENA DO REGO

Titulação do Orientador: Doutor

Faculdade: Ciências Biológicas

Instituto/Núcleo: IECOS – Instituto de Estudos Costeiros

Laboratório: GGC – GRUPO DE GENÉTICA E CONSERVAÇÃO

Nome do Bolsista: Hévila de Carvalho Mariano

Título do Plano de Trabalho: ESTUDO FILOGEOGRÁFICO DE *Odontophorus capueira* (AVES: ODONTOPHORIDAE), COM ÊNFASE NA COMPARAÇÃO DAS POPULAÇÕES DISJUNTAS DO NORDESTE/SUDESTE (Parte II).

Tipo de Bolsa:

- PIBIC/CNPq
- PIBIC/CNPq-AF
- PIBITI
- PIBIC/UFPA
- PIBIC/UFPA-AF
- PIBIC/UFPA-INTERIOR
- PIBIC/UFPA-EBTT
- PIBIC/UFPA-PcD
- PIBIC PRODOUTOR
- PIBIC PRODOUTOR RENOVAÇÃO
- PIVIC
- FAPESPA
- PIBIC-EM

1 INTRODUÇÃO:

A espécie *Odontophorus capueira* (Spix, 1825), conhecida popularmente por uru-capoeira, uru-do-nordeste ou perdiz-uru, é um pequeno galináceo florestal topetudo, pertencente à família Odontophoridae (Carroll & Kirwan, 2020) (Figura 1). Possui duas subespécies de distribuição disjunta encontrada no bioma Mata Atlântica: *Odontophorus capueira capueira* (Spix, 1825), que ocorre em regiões ao leste do Brasil, leste do Paraguai e no nordeste da Argentina (Clements *et al.*, 2016); e *Odontophorus capueira plumbeicollis* (Cory, 1915), ocorrendo em porções da região nordeste do Brasil (ICMBio, 2018).

Podem medir 24 centímetros de comprimento e pesar até 460 gramas. Os machos apresentam um topete maior que as fêmeas, contudo um pouco menor se comparado as espécies de urus amazônicos. Pernoitam nos espigões das serras, descendo pela manhã aos grotões para se alimentarem durante o dia. Seu forrageamento consiste em capturar frutos e sementes, e possivelmente pequenos artrópodes (Wikiaves, 2021). São territorialistas, convivem em bando e vocalizam em duetos. Nidificam no solo, às vezes dentro de um buraco, onde a ave choca cinco ovos ou mais e procriam nos primeiros meses do ano, no período seco (Roda, 2008).

Figura 1 - Espécie *Odontophorus capueira*, registro fotográfico feito por Raphael Jordan.



Segundo o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE), a subespécie *O. c. plumbeicollis* é endêmica do Brasil, ocorrendo originalmente nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Alagoas, porém com registros atuais apenas para o Ceará e Paraíba. Os índices de ocorrência da subespécie apontam declínios significativos de sua população, sendo a caça a maior ameaça ao táxon, junto com perda de habitat devido ao desmatamento das florestas de baixadas e matas secundárias conservadas. De acordo com as estimativas, atualmente a população total desta subespécie não ultrapassa 250 indivíduos adultos, com mais de 90% deles estando concentrados em uma única subpopulação na Serra de Baturité - Ceará, tornando a subespécie a mais pressionada dentro da família Odontophoridae (ICMBio, 2018).

Considerando a redução populacional de *O. c. plumbeicollis* e sua restrita distribuição, análises genéticas podem elucidar questões cruciais para futuros projetos de conservação que envolva esse táxon. Por se tratar de uma população disjunta e apresentar características fenotípicas como a coloração de plumagem que permitem distinção em relação a subespécie do sudeste (*O. c. capueira*) (Figura 2), *O. c. plumbeicollis* pode ser um táxon válido endêmico do Brasil, criticamente em perigo e pertencer à Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Da mesma forma, estaria também atendendo os critérios estabelecidos pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), sendo colocada como criticamente em perigo de extinção.

Figura 2 - Exemplares da Coleção do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, com as respectivas colorações para plumagem: acinzentada *O. c. capueira* e castanha *O. c. plumbeicollis*.



Com isso, este estudo objetiva compreender o padrão filogeográfico para a espécie *Odontophorus capueira*, avaliando por meio de marcadores moleculares (sequências mitocondriais e nucleares), se as subespécies correspondem às populações estruturadas e apresentam indicativos que validem sua elevação de nível taxonômico à espécie plena. Tais informações poderão ser utilizadas em futuros planos de conservação, principalmente para população do nordeste brasileiro.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral – Avaliar a estrutura molecular de *Odontophorus capueira*.

Objetivos específicos– verificar se a população disjunta localizada ao Nordeste (subespécie *O. c. plumbeicollis*) apresenta nível de diferenciação genética quando comparada à população encontrada na região sudeste (subespécie *O. c. capueira*).

Avaliar se as estruturações das linhagens moleculares encontradas de *Odontophorus capueira* apoiam a existência de duas espécies plenas.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostragem

O presente estudo foi embasado em duas amostras de tecido muscular e duas amostras de pena da subespécie *Odontophorus capueira plumbeicollis*, da região nordeste do Brasil, que foram cedidas pela ONG Aquasis (Associação de Pesquisa e Preservação de ecossistema Aquáticos); três amostras de sangue da subespécie *Odontophorus capueira capueira*, cedidas pelo MZUSP (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo); o grupo externo sendo composto por amostras de *Odontophorus stellatus*, onde o MPEG (Museu Paraense Emílio Goeldi) cedeu uma alíquotas de tecido muscular e também por sequências obtidas a partir do GenBank ([https:// www. ncbi. nlm. nih. gov/ genba nk/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)), com a inclusão de sequências da espécie *Odontophorus gujanensis*. As amostras foram armazenadas em álcool 70% e acondicionadas no Laboratório de Genética e Conservação na Universidade Federal do Pará, *Campus* de Bragança.

3.2 Procedimentos laboratoriais

O material genômico obtido passou pelo processo de extração do DNA utilizando o kit Wizard® Genomic Purification (Promega), de acordo com o manual do fabricante. O resultado da extração foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%. Em seguida, visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta, onde foi possível avaliar a presença, integridade e concentração do material genético. O DNA adquirido por meio da extração passou por um processo de seleção de fragmentos gênicos amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), para os marcadores: nuclear íntron-7 do Beta-Fibrinogênio (I7BF) e mitocondriais, NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) e Citocromo Oxidase I (COI). Os *primers*

para ND2 utilizados nesse trabalho foram descritos por Hackett (1996), com temperatura de anelamento de 54.4°C, combinação do L-5216 (5' GGCCCATACCCGRAAAAT 3') e H-6313 (5' CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC 3'); e para COI os *primers* descritos por Tavares e Baker (2008), com o anelamento a 53.2°C, Ltyr-F (5' TGTA AAAAGGGWCTACAGC-CTAACGC 3') e 907AH2-R (5' GTRGCNGAYGGTRAARTAT-GCTCG 3'). Na reação com I7BF foram usados iniciadores descritos por Prychitko e Moore (1997), FIB-BI7U (5' GGAGAAAACAGGACAATGACAATTCAC 3') e (5' TCCCCAGTAGTATCTGCCATTAGGGTT 3), com anelamento em 62°C.

Cada reação da amplificação foi conduzida para um produto final de 13 µL, contendo 2 µL de desoxinucleotídeos (1.25 mM), 1.25 µL de buffer, 0.5 µL de cloreto de magnésio (25 mM), 0.15 µL de cada *primer* (200ng/ µL), 0.1 µL da enzima Taq polimerase (5U/ µL - Invitrogen) e 1 µL do DNA total e adição de água purificada para complementação do volume final. A purificação dos produtos positivos desse processo foram feitos na placa de sequenciamento utilizando polietilenoglicol 20% (PEG 8000 20%) (Dunn e Blattner, 1987), posteriormente sequenciados pelo método didesoxitermal (Sanger, *et al.*, 1997) com reagentes do kit Big Dye (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction- Applied Biosystems, USA), seguindo as orientações do fabricante.

3.3 Análises computacionais

As sequencias de nucleotídeos, após serem geradas, foram editadas manualmente usando o software BioEdit v7.2.0 (Hall, 1999) e alinhadas no aplicativo implementado ao programa CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, 1997). Os sítios heterozigotos presentes nos produtos do marcador nuclear foram confirmados de acordo com os picos duplo no eletroferograma e codificados conforme o código de nucleotídeos da IUPAC. Utilizando algoritmo PHASE (Stephens & Donnelly, 2003) que é implementado no programa DNAsp (Librado & Rozas, 2009), foram obtidas fases gaméticas do marcador nuclear mediante as estimativas do método Bayesiano. Foram excluídas da análise as fases gaméticas que apresentaram probabilidade com valores menores que 0.6 e aquelas com probabilidade igual ou maior que foram consideradas resolvidas (Harrigan *et al.*, 2008).

Sequencias respectivas ao marcador ND2 adquiridas do GenBank e pertencentes aos táxons *O. capueira capueira* (KR732842; FR691582), *O. stellatus* (KR732841) e *O. gujanensis* (FR691583; KR732843) foram incluídas ao banco final de sequências.

Os genes mitocondriais (ND2 e COI) e o marcador nuclear (I7BF) foram concatenados no programa Sequence Matrix 1.8 (Vaidya *et al.*, 2011) para a reconstrução dos arranjos filogenéticos. A seleção dos melhores modelos de substituição nucleotídica e o melhor esquema de particionamento (gene ou códon) usando PartitionFinder 2.1 (Lanfear *et al.*, 2016), seguiram os critérios de Informação Akaike (AIC).

No MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) foi gerada a topologia baseada em Inferência Bayesiana (IB), a partir dos particionamentos indicados pelos melhores modelos evolutivos, por intermédio de quatro cadeias de Marcovianas de Monte Carlo (MCMC). Amostradas a cada 1000 gerações, duas árvores independentes com 10 milhões de gerações foram executadas, totalizando a geração de 10 mil árvores, as primeiras 1000 árvores geradas, equivalente a (10%), foram descartadas como *burn-in*.

A distância-p das taxas de divergências entre as subespécies foram calculadas pelo programa MEGAX (Tamura *et al.*, 2018). Os agrupamentos de *O. capueira* foram definidos fazendo o uso dos clados recuperados na IB. Além dos grupos recuperados na IB foram acrescentamos o grupo externo (*O. stellatus*), para gerar a rede de haplótipos no Haploview (Salzburger *et al.*, 2011). Através dos parâmetros de máxima verossimilhança no Phylip 3.6 (Felsenstein, 2004), foram reconstruídas as relações dos indivíduos na rede de haplótipos.

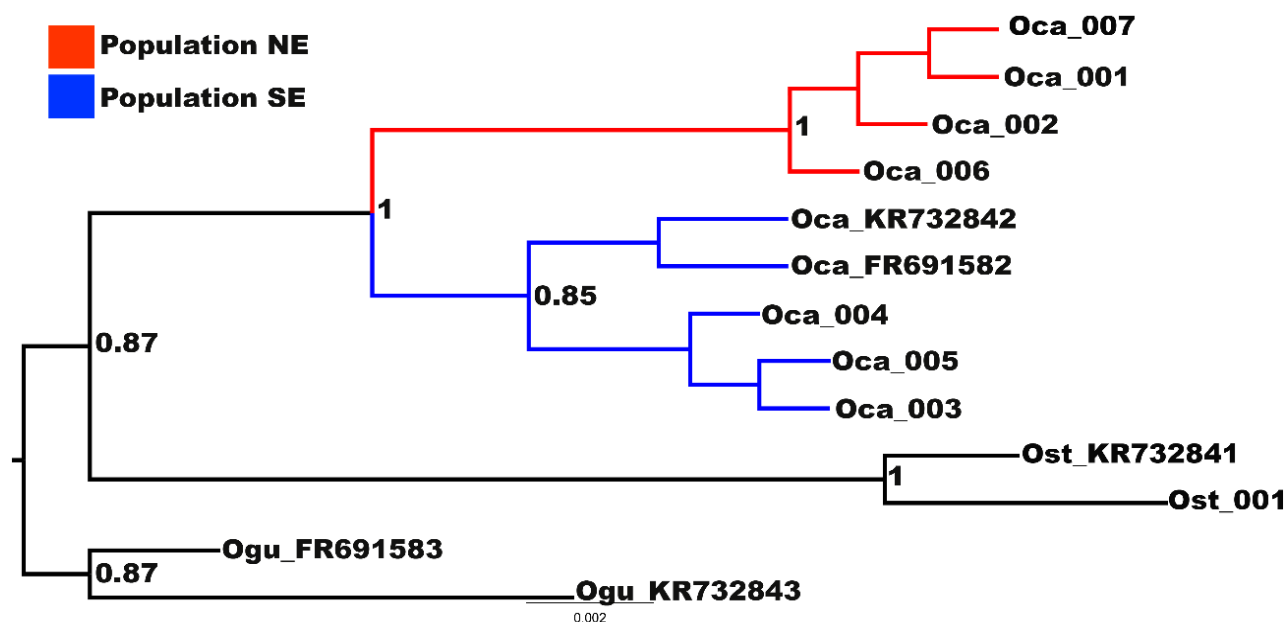
As estimativas do tempo de divergências para as linhagens de *O. capueira* foi feitas com base no modelo HKI+I gerado no Partition finder 2.1 (Lanfear *et al.*, 2016) para cada gene, sendo compiladas e obtidas com a abordagem da Coalescência Bayesiana executada no programa BEAST 1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012). O banco de informação de COI e I7BF foi avaliado com *missing-data* para o outgroup *O. stellatus*. Adiante, o banco concatenado foi exposto a uma corrida com o relógio relaxado com distribuição lognormal não correlacionada. Observamos que os valores de *ucl.d.stdev* permaneceram próximos de zero, apontando que a hipótese da taxa de substituição foi aceita. Dessa forma, estimamos a taxa de mutação para o COI e I7BF, com a adoção respectiva da distribuição de valores em curva Normal e Gamma, também adotamos o relógio molecular strict, inserindo uma taxa de mutação de 2.5 % por milhão de anos para o ND2 (média = 0,0125; SD = 0,1, Smith & Klicka, 2010). Amostradas a cada 5 mil gerações, o banco de dados foi submetido a duas corridas independentes com 50 milhões de gerações, totalizando 10 mil árvores, 10 % das árvores geradas foram descartadas como *burn-in*. O consenso das árvores foi verificado no TreeAnotador 1.8 (Rambaut *et al.*, 2018) após a convergência das cadeias corroboradas no TRACER 1.7.1. (Rambaut *et al.*, 2018) e valores assumidos de ESS > 200. Foram determinados no LogCombiner 1.8 (Rambaut *et al.*, 2018) o log dos arquivos da árvore com as árvores.

4 RESULTADOS

A topologia multiloci baseada em análise de Inferência Bayesiana evidenciou que as populações do Nordeste e Sudeste apresentaram reciprocidade monofilética com suporte máximo de $pp = 1$, havendo formação de dois grupos independentes dentro da espécie *Odontophorus capueira* (Figura 3). Os suportes indicados para as duas linhagens tiveram valores de $pp = 1$ para população do Nordeste (*O. c. plumbeicollis*) e $pp = 0.85$ para população do Sudeste (*O. c. capueira*), revelando para

esta última, a divisão entre as sequencias obtidas no GenBank com as que foram geradas para este estudo.

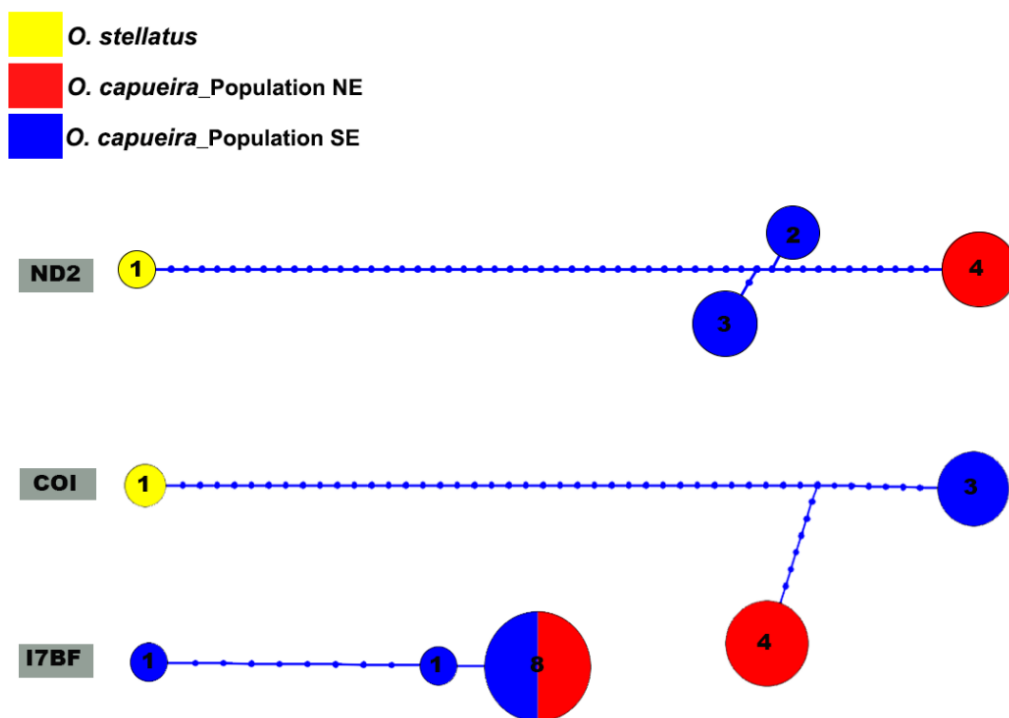
Figura 3 - Relação filogenética de *Odontophorus capueira* recuperada pelos fragmentos de ND2, COI e I7BF, que evidenciou duas populações, referindo-se as subespécies *O. c. plumbeicollis* (população Nordeste – ramos na cor vermelha) e *O. c. capueira* (população Sudeste – ramos na cor azul). Os valores dos suportes (pp) estão identificados em cada nó.



Os valores de divergência (distância-*p* não corrigida) entre as linhagens foram de 1,58% para o COI, 1,47% para o ND2 e 0,63% para o marcador nuclear (I7BF). A população do Nordeste não apresentou divergência entre os indivíduos para todos os marcadores, sendo verificado o valor de 0,15% (ND2) e de 1,03% (I7BF) entre os exemplares da forma nominal.

Apresentando concordância com a topologia de IB a rede de haplótipos mostrou a estruturação de dois haplogrupos bem definidos, tanto para ND2 quanto para COI, caracterizando às populações do Nordeste (*plumbeicollis*) e Sudeste (*capueira*). Foi identificado para marcador nuclear após o faseamento, um haplótipo mais frequente e compartilhado pelas duas subespécies, com mais dois haplótipos únicos para *O. c. capueira*. Os haplogrupos do ND2 estão distanciados por 12 mutações, enquanto os haplogrupos de COI estão separados por 14 mutações (Figura 4).

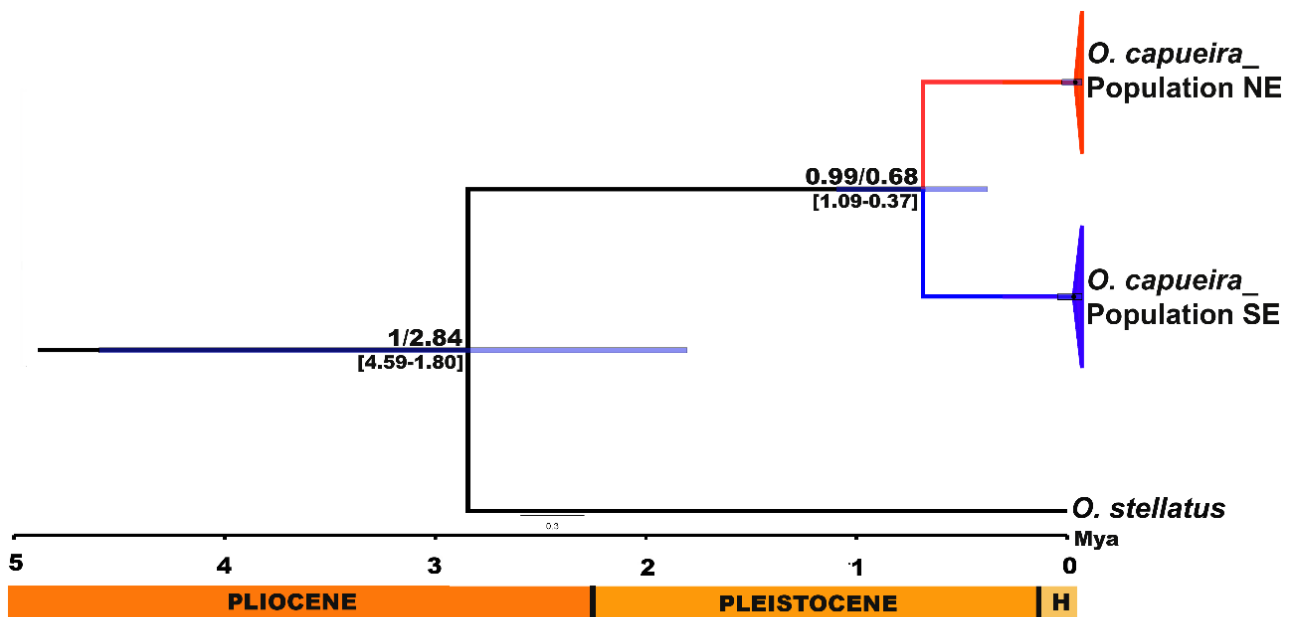
Figura 4 - Rede de haplótipos dos marcadores mitocondriais ND2 e COI, e do marcador nuclear I7BF. O haplogrupo em vermelho representa a população do Nordeste (*O. c. plumbeicollis*); o haplogrupo em azul, corresponde a população do Sudeste (*O. c. capueira*); e o grupo externo (*Odontophorus stellatus*) está destacado em amarelo. O número dentro dos círculos indica o número de haplótipos encontrados em cada marcador.



A árvore gênica evidenciou claramente a monofilia recíproca das subespécies dentro de *O. capueira*. A estimativa média do tempo de divergência entre as populações aponta que *O. c. capueira* e *O. c. plumbeicollis* divergiram durante o Pleistoceno Médio, com média de ~ 0.68 Ma (680 mil anos), dentro do intervalo de confiança variando entre 0.37 a 1.09 Ma (Figura 5).

A divergência genética encontrada entre estes grupos reforça que além das diferenças fenotípicas, as divergências genotípicas também indicam mudanças significativas que apontam a formação de grupos separados, ou seja, são populações estruturadas e que podem ter divergência compatível com a encontrada entre espécies válidas. Comparando os resultados de um trabalho semelhante a este, realizado com aves da família Trogonidae, as taxas de divergência entre as subespécies de *Odontophorus capueira* são mais altas quando comparadas as quais elevaram *Trogon chrysochloros* como uma nova espécie, tornando possível a intervenção de medidas conservacionistas para reverter o quadro Criticamente Ameaçada (Dickens *et al.*, 2021).

Figura 5 - Árvore gênica evidenciando o tempo de coalescência da população do Nordeste (*plumbeicollis* - vermelho) e do Sudeste (*capueira* - azul). Acima dos ramos e à esquerda da barra são os valores de probabilidades posteriores, à direita da barra, o tempo médio de divergência e abaixo dos ramos os valores correspondentes ao intervalo de confiança do tempo de divergência.



5 DIFICULDADES

Houve atraso na geração dos dados em razão da paralização do uso do sequenciador instalado no Instituto de Estudos Costeiros – Bragança durante o ano de 2021. Algumas amostras retornaram com erro de leitura e contaminação, fazendo necessário um novo envio de material para uma rodada de sequenciamento. Apesar do contratempo foi possível cumprir com o cronograma original do plano de trabalho.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos apontam para um nível de diferenciação genética significativo entre as duas subespécies de *Odontophorus capueira*, tornando necessária a reavaliação da categoria para uma alteração em sua classificação taxonômica, ressaltando a urgência de medidas de conservação para a população do nordeste. Entretanto, a reavaliação categórica é feita através de revisão por pares pelos especialistas do Comitê de Sobrevivência das Espécies da IUCN, (SSC), sendo a *BirdLife International* responsável pela classe Aves. Diante desta afirmação, é válido enfatizar que estamos trabalhando em conjunto com outros pesquisadores na construção de um artigo científico divulgando estes achados.

BIBLIOGRAFIA:

- Carroll, J. P.; G. M. Kirwan (2020). *Spot-winged Wood-Quail* (*Odontophorus capueira*), version 1.0. In Birds of the World (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, D. A. Christie, and E. de Juana, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. Disponível em: <<https://doi.org/10.2173/bow.swwqua1.01>>.
- Clements, J. F., T. S. Schulenberg, M. J. Iliff, D. Roberson, T. A. Fredericks, B. L. Sullivan, and C. L. The Clements checklist of Birds of the World: Version 6.9; Cornell: Cornell University Press, 2016. 1.
- Dickens, Jeremy Kenneth *et al.* Species limits, patterns of secondary contact and a new species in the Trogon rufus complex (Aves: Trogonidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 193, n. 2, p. 499-540, 2021.
- Dunn, I. S., & Blattner, F. R. (1987). Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and ploystuffers. *Nucleic Acids Research*, 15(6), 2677-2698. <https://bit.ly/2SnSAaP>.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss07>.
- Felsenstein, J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Retrieved from. <http://www.evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.
- Galetti JR, P. M. *et al.* 2008. Genética da conservação brasileira. pp.244-274. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 290p.
- Haffer, J. 1974. Avian speciation in tropical South America. Cambridge, Nuttall Ornithological Club. 390p. (Publication, n. 14).
- Hackett, Shannon J. Filogenética molecular e biogeografia de tanagers do gênero *Ramphocelus* (Aves). *Filogenética molecular e evolução*, v. 5, n. 2, pág. 368-382, 1996.
- Hall, T. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows TM. *Bioedit Version*, v. 7, 1999.

- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772–773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>.
- Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume III – Aves / -- 1. ed. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 7 v.1
- Kumar, S., Stecher, G., LI, M., Knyaz, C. and Tamura, K., (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, no. 6, pp. 1547-1549. Disponível em: PMID:29722887.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Tracer 1.7.1- Analyse Results from Bayesian MCMC programs such as BEAST & MrBayes. *Systematics Biology*, 67(5), 901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: inferência filogenética Bayesiana eficiente e escolha de modelo em um grande espaço de modelo. *Syst Biol* 61: 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Sanger, F.; Niclen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. ISSN 0027-8424.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47, 264-279. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb01215>.
- Salzburger, W., Ewing, G. B., & Von Haeseler, A (2011). The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20(9),1952-1963. <https://bit.ly/32B4EKn>
- Smith, B. T., & Klicka, J. (2010). The profound influence of the Late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of New World birds. *Ecography*, 33(2), 333–342. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.06335.x>
- Stamatakis, Alexandros. RAxML versão 8: uma ferramenta para análise filogenética e pós-análise de grandes filogenias. *Bioinformática*, v. 30, n. 9, pág. 1312-1313, 2014.

Tavares, Erika S.; Baker, Allan J. Códigos de barras de genes mitocondriais únicos identificam com segurança espécies-irmãs em diversos clados de pássaros. *BMC evolutionary biology*, v. 8, n. 1, pág. 1-14, 2008.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) A interface do Windows CLUSTAL_X: estratégias flexíveis para alinhamento de sequência múltipla auxiliado por ferramentas de análise de qualidade. *Nucleic Acids Res* 25 (24): 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.487>.

Vaidya G, Lohman DJ and Meier R. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171-180.

Wikiaves. Uru. Disponível em: <<https://www.wikiaves.com.br/wiki/uru>>. Acesso em: 03 de Agos. 2022.



ASSINATURA DO ORIENTADOR



ASSINATURA DO ALUNO