

Relatório de Cumprimento do Objeto**NOME DA ENTIDADE CONVENIADA/BENEFICIADA**

FUNDAÇÃO PARQUE TECNOLÓGICO ITAIPU - BRASIL

CNPJ: 07.769688/0001-18**CONVÊNIO Nº:** 4500048483**EXECUÇÃO:** 06/06/2018 – 06/06/2023**VIGÊNCIA:** 06/06/2018 – 06/06/2023

O valor previsto a ser repassado pela ITAIPU, no montante de **R\$ 4.868.532,00** referente ao Convênio acima citado, foi utilizado no objeto pactuado e na forma prevista no Plano de Trabalho apresentado, sendo que até o encerramento do Convênio o valor total repassado pela ITAIPU foi de **R\$ 4.868.532,00**.

OBJETIVO GERAL:

Identificar, quantificar e avaliar os principais micropoluentes na região transfronteiriça (BR-PY) em matrizes de relevância ambiental (água e solo), procurando compreender a dinâmica de disseminação destes no meio ambiente e sua relação com a biodiversidade.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS/METAS:

- Análise de micropoluentes nos riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR – PY) - Subprojeto 1.
- Efeito de micropoluentes na biodiversidade de algas e peixes de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR-PY) - Subprojeto 2.
- Estudo da dinâmica dos herbicidas atrazina, glifosato e 2,4-D em solo da região da BP3 (BR) - Subprojeto 3.

ADITIVOS E CONTROLE DE MUDANÇAS:

O primeiro controle de mudanças foi realizado em 2019, considerando a necessidade de substituição de uma bolsa DTI III para contratação de um biólogo com intuito de apoiar no desenvolvimento das atividades de campo, sobretudo nas etapas iniciais do projeto. Ainda no primeiro controle de mudanças foram alteradas as modalidades e a quantidade de bolsas em função das características estipuladas.

Também foram consideradas as contratações de manutenção de equipamentos e substituição de peças de equipamentos no cronograma físico. Outras adequações foram realizadas no cronograma físico, incluindo a seleção dos rios e pontos para monitoramento, que foi realizada após o seminário inaugural, com contribuição dos participantes. Adequações entre rubricas foram consideradas visando valores para viagens a campo.

No 2º controle de mudanças ocorreram adequações no número de campanhas de coleta previstas, considerando fatores técnicos. No mesmo documento, foi inserida a necessidade de contratação de serviço técnico especializado internacional, para tanto, adequações no cronograma financeiro foram realizadas, sem impactos ao valor total do convênio.

Para o 3º Controle de Mudanças, em 2021, foram previstas adequações no cronograma financeiro, devido a

Relatório de Cumprimento do Objeto

redução dos custos no decorrer da execução. Essa redução ocorreu devido a otimização dos métodos empregados que ocasionou redução de parte dos materiais necessários para extração e análise dos compostos considerados micropoluentes.

No período também houve a pandemia do vírus Sars-Cov2, onde parte dos trabalhos desenvolvidos em 2020 foram realizados por teletrabalho e não foi possível a realização dos métodos laboratoriais bem como as campanhas de coleta de campo, resultando em uma sobra de recursos em rubricas de passagens e diárias.

Com o intuito de atender as demandas da meta 2 do projeto e sanar outras demandas de espera para utilização de equipamentos, foi proposto a aquisição de novos equipamentos e remanejamento de recursos entre rubricas visando o atendimento da demanda. Adequações no cronograma físico foram realizadas para ajustar os períodos das entregas propostas que ficaram estagnadas devido à crise pandêmica, além de adequar o cronograma de execução das próximas etapas com uma nova estrutura para o cronograma físico, considerando os requisitos, premissas e restrições de cada meta, com foco em suas entregas e considerando também a matriz de responsabilidade e comunicação.

Em 2022 foi proposto o 1º Aditivo, considerando a prorrogação do convênio por um período de 6 meses, passando de 54 (cinquenta e quatro) meses para 60 (sessenta) meses. Tal aditamento visou o ajuste no cronograma físico que foi impactado pela pandemia em 2020 e 2021, além da inclusão de análises estatísticas, com foco principal nas entregas finais e realização da reunião técnica com pesquisadores internacionais, que ocorreu em novembro de 2022. Outras adequações no cronograma financeiro também foram realizadas, porém sem impactos no valor total do convênio.

Por fim, o 4º Controle de Mudanças após o aditivo considerou ajustes após aprovação do aditivo, uma vez que enquanto o mesmo estava em tramitação, ocorreram despesas de passagens e hospedagens cujos valores ultrapassaram as estimativas realizadas para o aditivo. Sendo assim, houve a necessidade de adequação dos valores dos itens previstos na rubrica “Passagens e Diárias”, considerando ainda que viagens estavam previstas destinadas a apresentação de resultados do projeto. Ademais, foi necessário a atualização do cronograma físico, bem como o remanejamento entre rubricas, considerando a reposição de materiais e reagentes, além da manutenção dos equipamentos.

RESULTADOS ALCANÇADOS:

1. Meta 1

Contratação dos colaboradores

Uma das primeiras etapas de execução do projeto foi a contratação dos dois pesquisadores de acordo com o plano de trabalho, sendo a colaboradora Bianca do Amaral a pesquisadora responsável pelas atividades de laboratório e os desenvolvimentos das metodologias de análise dos pesticidas, além do suporte para as demais atividades envolvendo a pesquisa com os bolsistas e o colaborador pesquisador João Durval Arantes Junior para as atividades relacionadas ao campo e suporte as demandas da meta 3. Porém, durante a execução das atividades, foi observado a necessidade de contratação um técnico para dar suporte no campo e com isso, o primeiro controle de mudanças ocorreu e o biólogo Diego Alberto Tavares, após passar pelo

Relatório de Cumprimento do Objeto

processo seletivo foi contratado.

1.1 Equipamentos, reagentes, insumos, análise de terceiros adquiridos

Na vigência deste projeto, foram adquiridos equipamentos para a execução das metas 2, 3 e 4. A execução dessas compras ocorreram principalmente no primeiro ano de vigência do projeto. Para exemplificar melhor, a seguir está disponível uma planilha com os materiais adquiridos durante a vigência total do projeto, a quantidade e o valor de cada item individualmente. Na sequência, há uma pequena descrição de onde e como esse equipamento foi utilizado durante o projeto, local onde ele se encontra e quem solicitou ou o responsável pelo bem.

Tabela 1. Equipamentos adquiridos durante a vigência do projeto, quantidade e valores pagos

Equipamento	Quantidade (uni.)	Valor pago (uni.)
Aagitadores magnéticos com aquecimento (Meta 2)	2	R\$ 2.843,00
Computador All in One (Meta 2)	1	R\$ 5.900,00
Computador (Meta 2) - UFRGS	1	R\$ 5.601,00
Monitor (Meta 2) - UFRGS	1	R\$ 1.700,00
Notebooks (Meta 2)	2	R\$ 7.000,00 R\$ 6.705,00
Geladeiras <i>frostfree</i> (Meta 2)	2	R\$ 2.399,00
Freezers (Meta 2)	2	R\$ 2.890,00
Ultrassom (Meta 2)	2	R\$ 4.315,00 R\$ 10.430,36
Vórtex (Meta 2)	3	R\$ 873,00
Bomba de vácuo (Meta 2)	2	R\$ 2.846,90
Chapa de aquecimento digital (Meta 2)	2	R\$ 1.136,00
Notebooks (Meta 3)	3	R\$ 9.145,00
Transiluminador UV/luz azul (Meta 3)	1	R\$ 5.618,00
Equipamento de pesca elétrica tipo (Meta 3)	1	R\$ 57.050,00
Máquina de gelo (Meta 3)	1	R\$ 9.090,00
Rotor para centrífuga refrigerada (Meta 3)	1	R\$ 3.809,00
Sonda multiparamétrica (Meta 3)	1	R\$ 23.155,65
Microscópio trinocular com sistema de captura de imagens (Meta 3)	1	R\$ 49.950,00
Molinete fluviométrico (Meta 3)*	1	R\$ 10.985,00
Incubadora com agitação refrigerada (Meta 4)	1	R\$ 34.424,00
Amostrador de solo (Meta 4)	1	R\$ 4.730,00
Concentrador rotativo de amostras a vácuo (Meta 2)	1	R\$ 162.108,12
Cromatógrafo iônico (Meta 2)	1	R\$ 400.000,00
Computadores (Meta 2)	2	R\$ 8.900,00
Monitores (Meta 2)	2	R\$ 1.183,00
Nobreak (Meta 2)	4	R\$ 2.390,00
Deionizador (Meta 2)	1	R\$ 829,93
Aparelho de Osmose reversa (Meta 2)	1	R\$ 5.538,14
Vórtex (Meta 2)	3	R\$ 1.920,23

Fonte: PTI, 2023.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Cada equipamento adquirido foi utilizado de acordo com o planejamento e construção do plano de trabalho, como mencionado anteriormente, a seguir há uma pequena descrição de onde esses equipamentos foram utilizados na pesquisa.

- Agitadores magnéticos com aquecimento foram adquiridos para o desenvolvimento das atividades envolvendo a meta 2, utilizado para homogeneizar as amostras de água e peixes entre outras amostras. Atualmente esses equipamentos se encontram disponíveis no laboratório ambiental de Itaipu.
- O computador All in One foi adquirido para atender as demandas de tratamento dos dados gerados na meta 2, porém ele foi acoplado aos cromatógrafos iônicos. Atualmente ele se encontra no laboratório 012, no prédio das águas - PTI, fase I.
- Um microcomputador e um monitor enviados para a UFRGS para os bolsistas da professora Carla Sirtori no desenvolvimento da meta 2 para o *screening* das amostras de pesticidas em águas superficiais. No término da meta executada pelos bolsistas, os equipamentos foram enviados para a UFPR e estão sob os cuidados do professor pesquisador Patrício Guillermo Peralta Zamora.
- Os notebooks foram adquiridos pela meta 2, sendo que um deles está com a pesquisadora do projeto professora Gilcélia Aparecida Cordeiro e o outro está no mezanino do laboratório 008 a disposição dos bolsistas para uso na pesquisa. Ambos foram adquiridos para facilitar os tratamentos de dados gerados no projeto e para atender as demais demandas necessárias.
- As geladeiras *frostfree* e os freezers foram adquiridos para armazenar as amostras coletadas da meta 2 e atualmente uma das geladeiras se encontra no laboratório 012 no prédio das águas - PTI, fase I e os demais itens no laboratório ambiental de Itaipu.
- Os ultrassons foram adquiridos para atender das demandas de limpeza de vidrarias e extração das amostras relacionados a meta 2. Um dos equipamentos foi enviada para a UFRGS sob a responsabilidade da pesquisadora professora Carla Sirtori que no término da execução das atividades dos bolsistas, os equipamentos foram enviados para a UFPR e estão sob os cuidados do professor pesquisador Patrício Guillermo Peralta Zamora. O outro equipamento encontra-se no laboratório ambiental de Itaipu.
- Os vórtex foram adquiridos para o preparo das amostras extraídas pela meta 2, sendo que 2 unidades foram utilizadas pelos bolsistas no laboratório ambiental de Itaipu e um foi enviado para a UFPR aos cuidados do professor Patrício Guillermo Peralta Zamora para o desenvolvimento de uma parte da metodologia de determinação de pesticidas em água.
- Bomba a vácuo para acoplar aos sistemas de filtração e Manifold, também atendendo as necessidades da meta 2 do projeto. As bombas a vácuo, juntamente com os sistemas de filtração são usadas para filtrar as amostras de águas superficiais e na sequência conectado ao Manifold para a extração pelo método de SPE. As bombas a vácuo se encontram disponíveis no laboratório ambiental de Itaipu.
- As chapas de aquecimento digital foram adquiridas para o preparo de amostras tanto da meta 2 como da meta 3 quando era necessário o aquecimento rápido das amostras. Atualmente as duas chapas de aquecimento estão disponíveis no laboratório 012 no prédio das águas - PTI, fase I.
- Os notebooks foram solicitados pelos pesquisadores da UNILA enquadrados na meta 3 (3 unidades) para o tratamento de dados, atualmente os computadores se encontram na posse dos professores Cleto

Relatório de Cumprimento do Objeto

Kaveski Peres, Luiz Henrique Garcia Pereira e Pablo Henrique Nunes.

- O transiluminador foi solicitado pelo pesquisador professor Luiz Henrique Garcia Pereira para a análise das amostras relacionadas a meta 3 do projeto. Atualmente o equipamento se encontra no mezanino do laboratório multiusuário, sala 002 do prédio das águas - PTI, térreo, fase I.
- O equipamento de pesca elétrica foi utilizado pelos pesquisadores da meta 3 para a coletas de peixes de pequeno porte nos riachos selecionados no início do projeto. O equipamento está armazenado no laboratório multiusuário, sala 002 do prédio das águas - PTI, térreo, fase I dentro do almoxarifado seco.
- A máquina de gelo foi adquirida para minimizar os custos com a compra de gelo para armazenar as amostras de peixes e outras espécies estudadas dentro da meta 3, o equipamento está sob a responsabilidade do professor Luiz Henrique Garcia Pereira e instalado no mezanino do laboratório multiusuário, sala 002 do prédio das águas - PTI, térreo, fase I.
- O rotor para centrífuga refrigerada foi uma solicitação do pesquisador professor Luiz Henrique Garcia Pereira para compor uma centrífuga já existente no laboratório com patrimônio da UNILA. A peça do equipamento foi utilizada para colocar pequenas placas com amostras para o preparo e ensaio de amostras dentro da meta 3 deste projeto. A peça se encontra no mezanino do laboratório multiusuário, sala 002 do prédio das águas - PTI, térreo, fase I.
- A sonda multiparâmetro foi adquirida para analisar em campo 7 parâmetros como: temperatura da água, condutividade, pH, oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos, turbidez e o potencial oxi-redução, sendo realizada as análises entre as metas 2 e 3 do projeto, de acordo com o período da coleta as amostras. A sonda se encontra sob as responsabilidades dos técnicos do PTI e está armazenada no laboratório 012 no prédio das águas - PTI, fase I.
- O microscópio trinocular com sistema de captura de imagens foi solicitado pelos pesquisadores da meta 3 sob a responsabilidade do pesquisador professor Cleto Kaveski Peres para a análise diatomáceas capturadas nos pontos de coleta selecionadas no projeto. Atualmente, o equipamento se encontra alocado no mezanino do laboratório multiusuário, sala 002 do prédio das águas - PTI, térreo, fase I.
- O molinete fluviométrico inicialmente era para ser um correntômetro digital, porém, por solicitação dos pesquisadores da meta 3 foi substituído. Foi utilizado nas campanhas durante as coletas para verificar a vazão dos pontos de coleta. OBS.: Esse equipamento já não está mais em funcionamento, pois houve avarias durante uma das campanhas realizada pela equipe de meta 3.
- A incubadora com agitação refrigerada foi adquirida para atender as demandas da meta 4 e está sob a responsabilidade da pesquisadora professora Rafaella Costa Bonugli Santos. O equipamento hoje se encontra das dependências da UNILA, situado no campus do jardim universitário (JU).
- O amostrador de solo foi uma solicitação do pesquisador professor Gunther Brucha para a coleta das amostras de solo referente a meta 4. Atualmente o equipamento está alocado no laboratório 008 do prédio das águas - PTI, térreo, fase I, juntamente com outros materiais de campo do projeto NIT.
- Concentrador rotativo de amostras a vácuo foi adquirido em 2022 após ajuste orçamentária para facilitar o processo de preparo das amostras analisadas pela meta 2 de determinação de pesticidas em água

Relatório de Cumprimento do Objeto

superficial. O equipamento se encontra no laboratório ambiental de Itaipu.

- Assim como o concentrador rotativo, o cromatógrafo iônico foi adquirido em 2022 após ajuste orçamentário, sua necessidade se deu a grande quantidade de amostras que eram analisadas no projeto Micropoluentes II e demais, pois o equipamento adquirido pela Itaipu já não estava mais atendendo as demandas dos outros projetos. O equipamento se encontra no laboratório 012, no prédio das águas - PTI.
- Os computadores e monitores foram adquiridos para os técnicos do PTI, pois ambos estavam com equipamentos antigos que estavam dando problema, hoje eles estão disponíveis no mezanino do laboratório 008, situado no prédio das águas - PTI.
- Os nobreaks foram instalados nas redes dos cromatógrafos iônicos e nos computadores dos colaboradores do projeto. Podem ser localizados no mezanino do laboratório 008 e no laboratório 012, ambos no prédio das águas - PTI.
- O sistema de deionização e a osmose reversa foram adquiridos em 2022 para a produção de água do tipo I, pois durante as campanhas do projeto, observou-se um problema no sistema da Itaipu, além da necessidade de se ter um sistema de purificação de água para alimentar os laboratórios situados no prédio das águas. Ele está instalado no laboratório 012, situado no prédio das águas - PTI.
- Para finalizar, foram adquiridos mais vórtex para auxiliar no preparo das amostras, pois os que havíamos comprado no início do projeto quebraram ou já não estão funcionando da maneira correta, também foram usados para o preparo das amostras da meta 2. Uma dos vórtex está no laboratório 012, situado no prédio das águas - PTI e os outros dois estão no laboratório ambiental de Itaipu.

1.2 Constituição do laboratório

Para a execução do projeto, equipamento, reagentes, insumos entre outros materiais laboratoriais foram adquiridos. Como o projeto foi separado por metas de acordo com proposto no plano de trabalho, laboratórios em locais diferentes necessitaram passar por processos de reestruturação para atender essas demandas e atender os objetivos propostos. Para melhor visualização das estruturas, separamos por metas e ilustrado com as fotos dos locais de desenvolvimento do método e em algumas situações as análises sendo realizadas. Na meta 2, foram utilizados os laboratórios da UFRGS no estado do Rio Grande do Sul, o laboratório da UFPR (situado na cidade de Curitiba no Paraná), laboratório da Itaipu Binacional (Laboratório Ambiental de Itaipu), o laboratório multiusuário (sala 002 – PTI), mezanino do laboratório 008 (sala 008 – PTI) e o laboratório 012 (sala 012 – PTI).

No laboratório da UFRGS no Rio Grande do Sul, foram realizadas as análises de *screening* das amostras de água que iniciaram em 2019 e finalizaram em 2020, totalizando 6 campanhas, sobre o processo de preparo e análise, as informações estarão disponíveis dentro da meta 2 deste relatório.

No laboratório da UFPR, foram executadas as atividades da meta 2 com foco nas atividades da bolsa da DTI II/doutorado Renata Prussak Gabardo onde o objetivo era o desenvolvimento das metodologias para determinação de atrazina e seus metabólitos em matriz de água superficial e um método para determinação de glifosato e AMPA também em matriz de água superficial.

No laboratório da Itaipu Binacional (Laboratório Ambiental de Itaipu), foram executadas a maior parte dos

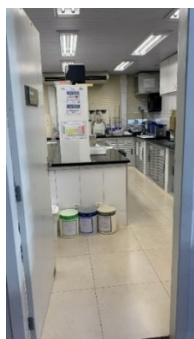
Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 7 de 92

ensaios propostos dentro da meta 2. Nas imagens a seguir estão algumas informações sobre alguns preparos de amostras, estrutura física e equipamentos adquiridos para o desenvolvimento.



Entrada do laboratório de preparo



Área interna do laboratório



Adequação da casa de gases para instalação dos cromatógrafos



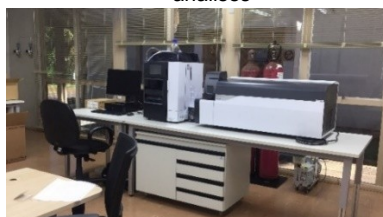
Espaço interno do laboratório durante as análises



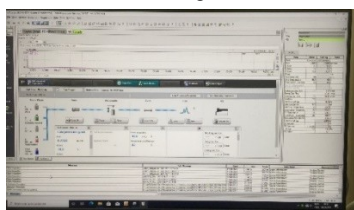
Processo de extração por SPE das amostras de água



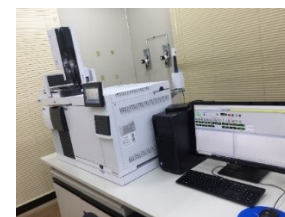
Entrega de equipamentos



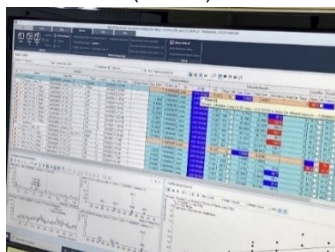
Instalação do cromatógrafo em fase líquida (LC-MS)



Tela do software Labsolution do cromatógrafo em fase líquida



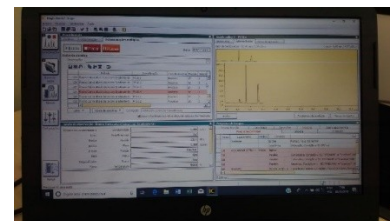
Durante as análises de pesticidas no cromatógrafo em fase gasosa (GC-MS)



Interface do programa MassHunter para as análises de pesticidas por GC-MS



Cromatógrafo iônico (IC) adquiridos pela Itaipu Binacional e PTI



Interface do programa MagIC Net para acompanhar e tratar os dados gerados no cromatógrafo iônico



Utilizando o concentrador de amostras para a troca de solvente de extração para o solvente de eluição/injeção

Fonte: PTI, 2023.



Amostras sem solvente de extração prontas para ser adicionado o solvente de extração para injeção

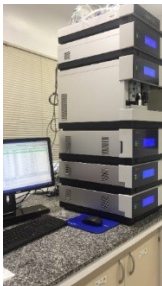
No laboratório multiusuário (sala 002 – PTI), foram realizados os ensaios nos cromatógrafos da UNILA como contrapartida do projeto. Assim como no primeiro projeto Micropoluentes, foram realizados os ensaios

Relatório de Cumprimento do Objeto

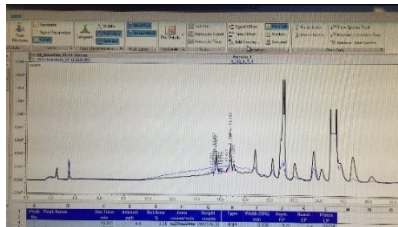
Página 8 de 92

cromatográficos para determinação de pesticidas nas amostras coletadas de águas superficiais. Não foram adquiridos equipamentos para atender a meta 2 para serem alocados neste laboratório, pois os equipamentos já haviam sido adquiridos no projeto anterior. Nos cromatógrafos como o HPLC foram analisadas as amostras de água para determinação de glifosato e AMPA, as amostras de sedimento da meta 4 para também determinação de glifosato e AMPA e determinação de atrazina em sedimento dos microcosmos. No GC-FID, foram realizadas as análises de ácidos graxos em peixe para quantificação de ácido docosahexaenóico (DHA). No GC-MS single quadrupolo foram analisadas as amostras de ácidos graxos em peixe para determinar os tempos de retenção e o desenvolvimento do método para a determinação de multirresíduos de pesticidas em amostras de água.

Foram comprados reagentes de alto grau de pureza para serem utilizados nos cromatógrafos e os gases de arraste também foram adquiridos de acordo com a demanda.



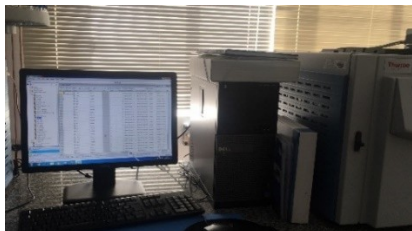
Cromatógrafo em fase líquida (HPLC)



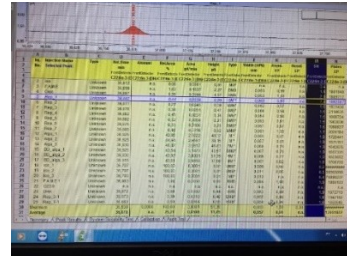
Cromatograma das amostras de água para determinação de glifosato e AMPA



Concentrador de amostras

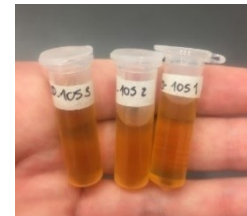


Cromatógrafo em fase gasosa com detector de chamas (GC-FID)

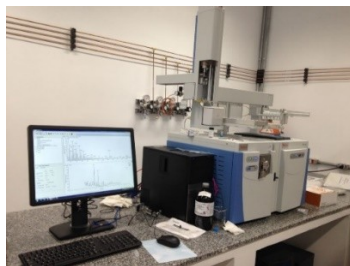


Nome	Tempo de Retenção	Área	Concentração
Ácido Palmítico	1.23	12345	0.12
Ácido Palmítico	1.45	23456	0.23
Ácido Palmítico	1.67	34567	0.34
Ácido Palmítico	1.89	45678	0.45
Ácido Palmítico	2.11	56789	0.56
Ácido Palmítico	2.33	67890	0.67
Ácido Palmítico	2.55	78901	0.78
Ácido Palmítico	2.77	89012	0.89
Ácido Palmítico	2.99	90123	0.90
Ácido Palmítico	3.21	01234	0.01

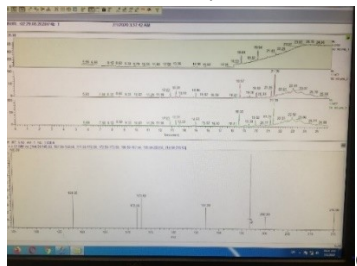
Sequência de ácidos graxos obtidos as amostras de óleo de peixe esterificada



Extração de ácidos graxos de peixe para determinação de ácido docosahexaenóico



Cromatógrafo em fase gasosa com detector de massas single quadrupolo (GC-MS)



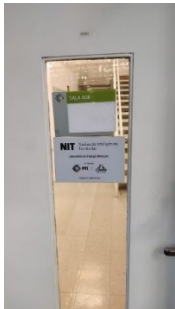
Cromatograma da primeira fase do projeto para a determinação dos pesticidas em amostras de água

Fonte: PTI, 2023.

No ano de 2021, os colaboradores da fundação PTI foram realocados do escritório das salas 202 e 2023 para o mezanino do laboratório 008 do prédio das águas - PTI (sala 008 – PTI), essa demanda se fez necessária devido o constante trânsito dos colaboradores entre os laboratórios e para facilitar a logística. Na parte inferior do mezanino da sala 008 se encontra o laboratório de outro projeto, esse projeto está vinculado ao projeto NIT

Relatório de Cumprimento do Objeto

e o objetivo é a detecção de SARS-CoV-2 em efluente.



Porta de entrada do laboratório e acesso ao mezanino (escritório)

Fonte: PTI, 2023.



Visão na parte interna do laboratório 008



Visão do mezanino após a mudança

O laboratório 012 (sala 012 – PTI) foi o último laboratório a ser montado para facilitar o trabalho dos bolsistas da meta 2, como as atividades estavam todas concentradas no laboratório ambiental e o espaço físico não comporta mais de 6 pessoas trabalhando simultaneamente, verificamos a necessidade e avaliamos a disponibilidade de uso do espaço, já que a pesquisa que estava sendo desenvolvida ali foi transferida para outra área da fundação.

Após uma pequena reestruturação do espaço, todos os ensaios físico-químicos desenvolvidos no laboratório ambiental foi transferido para esse laboratório, para contemplar também, outros projetos alocados no NIT.



Visão da entrada do laboratório



Imagem da mudança para o espaço



Imagem do espaço antes da limpeza do piso com cera



Imagem da mudança para o espaço



Transferência dos cromatógrafos iônicos do laboratório ambiental para o novo espaço

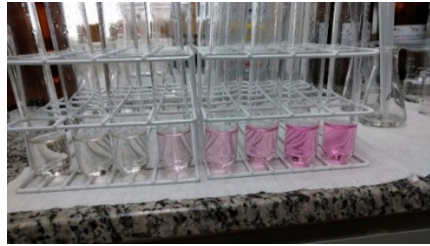


Mezanino do laboratório 012 antes de colocarmos os materiais de campo e estoque

Relatório de Cumprimento do Objeto



Além do IC, o espectrofotômetro também foi transferido para o laboratório 012
Fonte: PTI, 2023.



Análise de nitrogênio total

Na meta 3 e 4, foram utilizadas as estruturas de laboratórios do prédio das águas, dentro do laboratório multiusuário (sala 002 – PTI), laboratórios da UNILA no jardim universitário (JU), laboratórios da UFABC e laboratórios da UNIFAL (Minas Gerais).



Recebimento e processamento das amostras coletadas no laboratório do jardim universitário



Processo de classificação dos peixes no laboratório do jardim universitário



Processo de triagem e identificação das espécies de peixes no laboratório do jardim universitário



Coleta e processamento do material biológico (sangue e brânquias) no laboratório do jardim universitário



Obtenção das medidas morfofuncionais dos peixes no laboratório do jardim universitário

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 11 de 92



Processamento das amostras de solo dos microcosmos no Jardim Universitário



Reatores anaeróbicos montado no laboratório da UNIFAL



Liofilização das amostras de sedimento para envio a UFABC

Fonte: PTI, 2023.

As amostras de sedimento foram coletadas e encaminhadas para o laboratório ambiental, para passar pelo processo de liofilização antes de ser enviada para a Universidade Federal do ABC (UFABC) para assim serem extraídas e encaminhadas novamente para o PTI para realizarmos as análises no cromatógrafo da UNILA para a determinação dos pesticidas (glifosato e AMPA).

1.3 Número de bolsistas

Durante a vigência do projeto, foram disponibilizadas um total de 39 bolsas, distribuídas entre as três metas. Na meta 2 foram 17 bolsas, sendo 10 bolsas de IC (Iniciação científica), 1 bolsa de DTI I, 4 bolsas de DTI II, 1 bolsa de DTI III e uma bolsa de doutorado.

Na meta 3 foram 17 bolsas, sendo 7 bolsas de IC (Iniciação científica), 3 bolsas de DTI I, 4 bolsas de DTI II, 1 bolsa de DTI III e 2 bolsas de Pos Doc. (pós-doutorado).

E na meta 4, foram 5 bolsas, sendo 4 de DTI I e 1 de mestrado.

É importante ressaltar a importância desses bolsistas durante toda a vigência do projeto, pois eles foram os principais atores na produção dos resultados gerados dentro das suas respectivas metas de atuação, reforçando a formação de capital humano ao longo do projeto.

1.4 Serviço de terceiros

1.4.1 Análise de agrotóxicos em solo

- Serviço de análise de solo com a empresa Bioagri Ambiental Ltda em 2018 (Meta 4, R\$1.492,21). Parâmetros analisados: Alaclor, Aldrin, AMPA, Atrazina, Cis Clordano (Alfa Clordano), DDD (isômeros), DDE (isômeros), DDT (isômeros), Dieldrin, Dodecacloropentaciclodecano, Endossulfan - ALFA, Endossulfan - BETA, Endossulfan Sulfato, Endrin, Glifosato, HCH Alfa, HCH Beta, HCH Delta, Heptacloro e Heptacloro Epóxido, Hexaclorobenzeno, Lindano (g-HCH), Metolacloro, Metoxicloro, Porcentagem de Sólidos, Trans Clordano (Gama Clordano). Nenhum composto foi detectado nas amostras.

- Serviço de análise de solo com a empresa Tecpar em 2019 (Meta 4, R\$1.530,00). Parâmetros avaliados: 2,4 D, ametrina, atrazina, azoxistrobina, bentazona, carbaril, carbendazim, carbofurano-3-hidróxido, carbofurano, cialofope, butílico, cianazina, clomazona, clorimurom-etílico, clorpirifós-etílico, clorprofam, cresoxim-metílico,

Relatório de Cumprimento do Objeto

difenoconazol, dimetoato, diurom, epoxiconazol, etoxissulfurom, fenamidona, fentiona, fluasifope-Pbutílico, fluroxipir, flutolanil, imazamoxi, imazapique, imazapir, imazaquim, imazetapir, imidacloprido, linurom, metalaxil, metconazol, metsulfurom-metílico, molinato, monolinurom, nicossulfurom, oxifluorfem, penoxsulam, piraclostrobina, pirazossulfurom-etílico, piridabem, piridato, pirimifós-metílico, profenofós, propanil, propargito, propiconazol, propoxur, quincloraque, quizalofope-P-etílico, saflufenacil, simazina, tebuconazol, terbutilazina, tetraconazol, tiabendazol, tiametoxam, tiobencarbe, tiofanato-metílico, tolclofós-metílico, triciclazol, trifloxistrobina. Nenhum composto foi detectado nas amostras.

- Serviço de análise de solo com a empresa LARP em 2019 (Meta 4, R\$400,00). Análise do herbicida atrazina (ATZ) em matriz de solo provenientes do experimento de microcosmos. Atrazina foi detectada na concentração de 0,020 mg kg⁻¹.

1.4.2 Análise de DNA em amostras de peixe

- Análises Moleculares para Sequenciamento completo de genoma com cobertura de 50X e (genotipagem por sequenciamento (GBS) de duas espécies de peixes foi contratado da empresa Elshire Group Ltd (Nova Zelândia). Na época da contratação não havia empresa especializada nesse serviço no país e o período de lockdown devido a pandemia causada pelo SARS-CoV-2 também impossibilitou o envio das amostras. As amostras foram preparadas sob supervisão do prof. Luiz, que juntamente com a bolsista na época, não mediram esforços para adequar as amostras conforme o solicitado pela empresa. Tentamos em duas oportunidades enviar as amostras, mas devido a problemas na logística, as amostras chegaram a Nova Zelândia, mas não estavam íntegras para análise. Optou-se então por cancelar essa contratação. A empresa encaminhou relatório do serviço parcial executado para os testes de recuperação de amostras (na qual indicou a impossibilidade de análise total das amostras enviadas na primeira vez) e testes para otimização dos kits para extração do DNA, sendo contabilizados os gastos com equipamento, insumo e taxas administrativas, totalizando NZD \$7,060 (R\$ 25.793,00, Meta 3).

1.4.3 Análise de DNA/RNA em solo

-Análises Moleculares referente ao sequenciamento de nova geração da região ITS para identificação de fungos e do RNA total (fungos) de solo agrícola do ponto Solo Vivo na cidade de Toledo/PR coletado em 19 de março de 2019 e dos 3 microcosmos (controle e 2 concentrações de atrazina) elaborados para estudar o efeito do defensivo agrícola na diversidade de fungos com a BPI Tecnologia, Pesquisa e Inovação Ltda (Meta 4, R\$4.904,64). Parte do serviço inicialmente contratado não foi realizado devido a problemas na purificação das amostras.

- Análise molecular de amostras de solo relacionado ao subprojeto: Diversidade Genética e Funcional de Fungos Filamentosos em Solo com Atrazina com a BPI Tecnologia, Pesquisa e Inovação Ltda. A análise usando sequenciadores de última geração permite o conhecimento da diversidade microbiana não cultivável, sendo a estratégia atualmente utilizada nos estudos (Meta 4, R\$ 13.980,60).

1.4.4 Manutenção de equipamentos

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 13 de 92

- Manutenção corretiva e preventiva do GC-MS da marca Thermo instalado no Laboratório do Multiusuário Profa. Enedina Marques PTI em 2019 (Meta 2, R\$30.847,53).
- Manutenção corretiva do microscópio óptico Carl Zeiss modelo AXIO Scope A1 instalado no Laboratório do Multiusuário Profa. Enedina Marques PTI em 2020 (Meta 3, R\$1.200,00)
- Manutenção preventiva e corretiva do Cromatógrafo Líquido da marca Thermo Scientific instalado no Laboratório do Multiusuário Profa. Enedina Marques PTI em 2021 (Meta 2, R\$24.368,76)
- Manutenção do equipamento Seven Excellence pH/Cond/DO meter S479-K e substituição do sensor de oxigênio instalado no Laboratório Ambiental em 2021 (Meta 2, R\$2.341,00)
- Manutenção corretiva e preventiva do gerador de nitrogênio Genius 1051 (Peak Scientific) do LC-MS/MS instalado no Laboratório Ambiental em 2022 (Meta 2, R\$12.582,87)
- Manutenção preventiva do Cromatógrafo Líquido com Espectrômetro de Massas instalado no Laboratório Ambiental em 2022 (Meta 2, R\$17.708,00)
- Manutenção preventiva e corretiva do Cromatógrafo Líquido e detector de fluorescência da marca Thermo Scientific instalado no Laboratório do Multiusuário Profa. Enedina Marques PTI em 2022 (Meta 2, R\$57.311,72)
- Manutenção corretiva e preventiva do gerador de nitrogênio Genius 1051 (Peak Scientific) do LC-MS/MS instalado no Laboratório Ambiental em 2023 (Meta 2, R\$13.895,89)
- Manutenção concentrador rotativo a vácuo e liofilizador de amostras da marca Christ instalado no Laboratório Ambiental em 2023 (Meta 2, R\$7.896,00)
- Serviço de qualificação e calibração de Balança analítica marca SHIMADZU modelo ATX224 instalada no Laboratório Ambiental em 2022 (Meta 2, R\$2.500,00)

1.4.5 Outras análises

- Análises centesimais de umidade, proteína bruta, lipídios e matéria mineral em amostras de peixe e ração com a incorporação da microalga Schizochytrium sp. (DHA goldTM®, DSM Nutritional Products) em 2021 (Meta 2, R\$2.632,50).

1.5 Seminário inaugural

O seminário inaugural do projeto foi realizado no dia 05/10/2018 com a participação de todos os colaboradores externos do convênio vigente e integrantes do convênio Micropoluentes I. Os principais resultados obtidos ao longo do convenio anterior e as propostas de trabalho para o novo projeto foram apresentadas e discutidas.



Fonte: PTI, 2018.

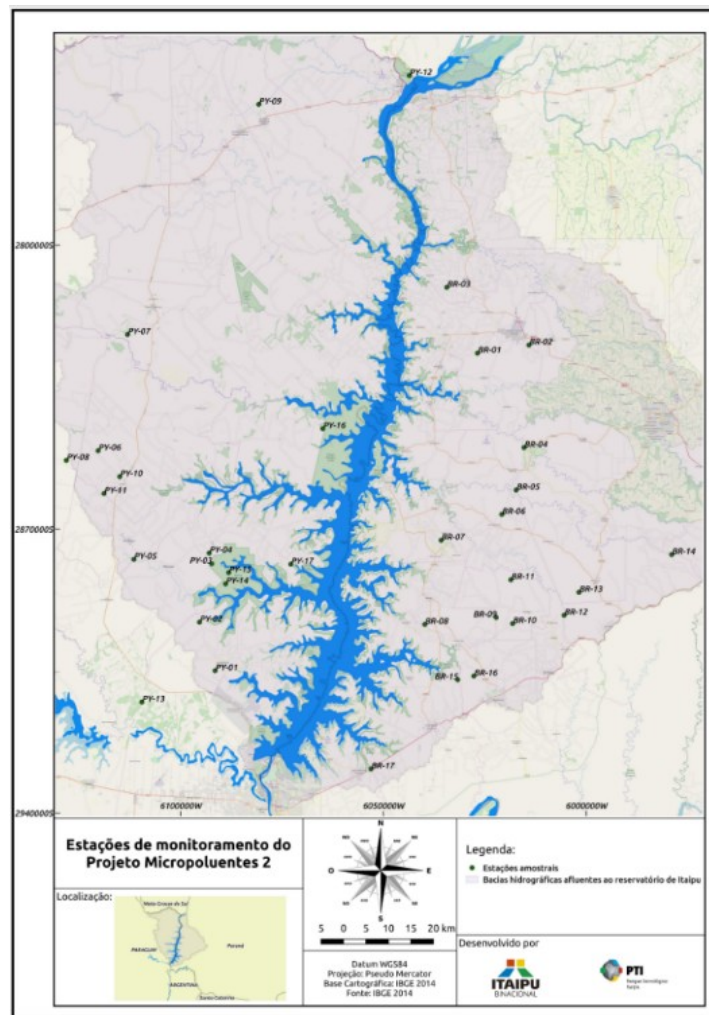
2. Meta 2

Relatório de Cumprimento do Objeto

2.1 Seleção dos rios

Para a seleção dos rios a serem amostrados foram elencados 17 riachos na margem brasileira e 17 na margem paraguaia a partir de pré-seleção de bacias de interesse de Itaipu Binacional.

Figura 1. Mapa de pontos de amostragem do Projeto Micropoluentes II na pré-seleção.



Fonte: PTI, 2018.

Foram realizadas coletas Piloto no Brasil e Paraguai com a pré-seleção dos pontos de coleta. Houve dificuldades de acesso a alguns pontos e foram diagnosticados poucos fragmentos florestais expressivos com corpos d'água protegidos desde a nascente, tanto no Brasil quanto no Paraguai.

Durante a seleção dos pontos foi elaborado o Percentual de Uso e Ocupação do solo a partir da vetorização de imagens de satélite para auxílio na definição dos pontos de amostragem, conforme tabela abaixo.

Tabela 2. Percentual de Uso e Cobertura do Solo nas bacias pré-selecionadas

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 15 de 92

Ponto Amostr	Construção (%)	Pastagem (%)	Corpos d'Água (%)	Vegetação (%)	Agricultura (%)
MBR-01	2,74	15,44	1,15	25,25	55,41
MBR-02	3,18	6,05	0,43	18,99	69,56
MBR-03	2,12	7,51	0,33	16,07	73,96
MBR-04	2,89	56,45	0,32	19,12	20,13
MBR-05	1,36	39,67	0,17	19,31	39,49
MBR-06	5,90	58,27	0,61	21,95	12,61
MBR-07	1,34	35,51	0,88	29,43	31,05
MBR-08	2,87	18,87	0,88	12,39	64,40
MBR-09	1,67	75,86	0,30	17,74	3,53
MBR-10	3,11	65,97	0,25	21,59	9,09
MBR-11	1,34	49,60	0,13	31,02	17,17
MBR-12	2,54	7,50	0,20	18,50	69,91
MBR-13	1,34	13,67	0,29	14,92	69,00
MBR-14	1,53	8,07	0,11	22,32	67,93
MBR-15	1,81	15,73	0,32	15,00	66,76
MBR-16	24,11	9,10	0,17	14,49	51,70
MBR-17	1,58	8,32	0,72	10,97	78,04
MPY-01	1,26	14,49	0,14	8,22	75,9
MPY-02	1,72	6,82	0,38	11,21	79,59
MPY-03	1,27	5,65	0,08	17,54	73,26
MPY-04	3,02	13,69	0,08	5,02	78,07
MPY-05	5,97	17,88	0,24	9,23	66,35
MPY-06	1,18	2,77	0,08	15,26	80,71
MPY-07	1,13	5,80	1,61	16,01	73,12
MPY-08	0,48	0,18	0,00	53,29	46,05
MPY-09	1,13	5,8	1,6	18,34	73,12
MPY-10	1,64	5,57	1,06	6,83	84,90
MPY-11	1,59	4,71	0,08	10,14	83,15
MPY-12	1,97	5,17	0,17	7,73	84,96
MPY-13	0,3	14,06	1,65	62,34	21,64
MPY-14					
MPY-15	1,32	0,00	7,50	69,53	21,65
MPY-16	0,35	0,00	1,69	36,36	61,60
MPY-17	2,31	25,52	1,34	12,90	57,93

Fonte: PTI, 2023.

A partir de resultados de nutrientes e agrotóxicos e à luz dos resultados e da caracterização do uso e ocupação do solo, 24 estações serão selecionadas e divididas em 3 grupos:

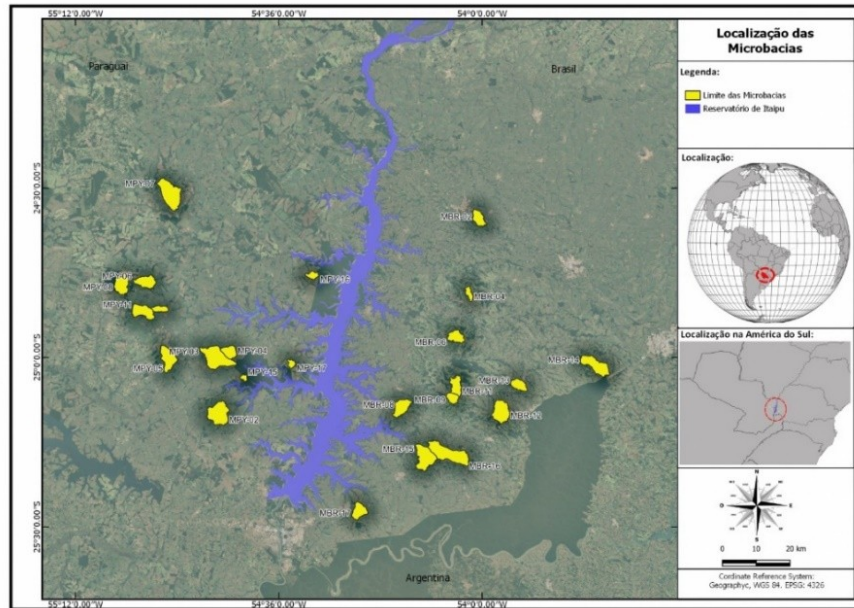
- riachos localizados em áreas mais conservadas, predominantemente não agrícola e com baixa pressão de micropoluentes (com menor número de micropoluentes);
- riachos impactados pela agricultura e com moderado registro de micropoluentes;
- riachos impactados pela agricultura e com alta pressão de micropoluentes.

Para evitar conflitos com a nomenclatura dos pontos foi realizada padronização a partir dos seguintes critérios:

- M = Micropoluentes
- BR ou PY = País de origem do riacho
- XX = Número no qual o ponto de amostragem foi identificado na pré-seleção.

Figura 2. Mapa de localização das bacias selecionadas no Projeto Micropoluentes II.

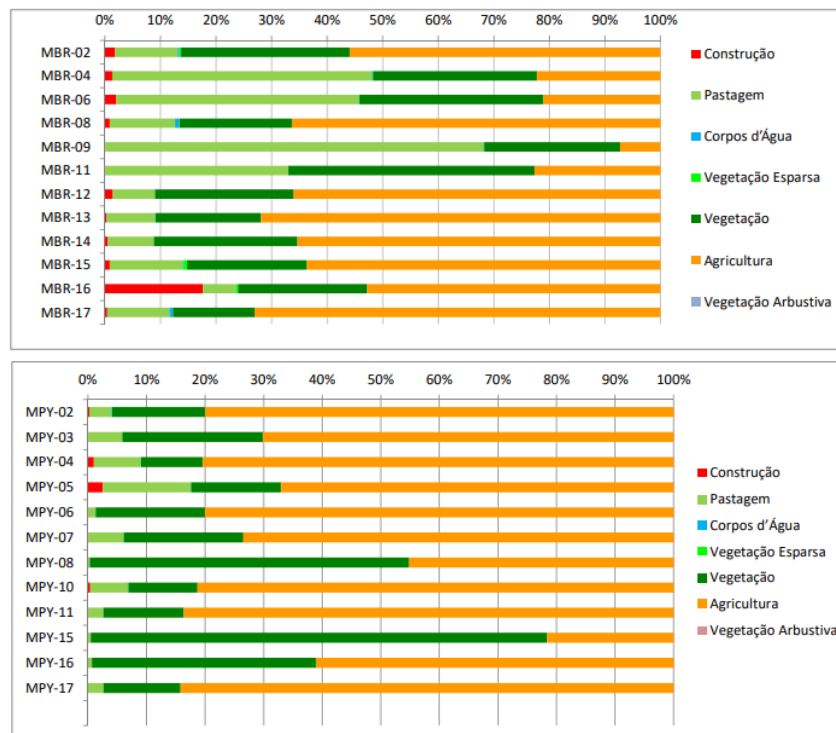
Relatório de Cumprimento do Objeto



Fonte: PTI, 2022.

Em 2022, uma nova caracterização do Uso do Solo foi realizada no intuito de padronizar a informação considerando bases de dados consolidadas mundialmente, no caso a ESA WorldCover, com uma resolução de 10 metros e com resultados apresentados na figura abaixo.

Figura 3. Distribuição do percentual de Uso do Solo nas Bacias selecionadas no Projeto Micropoluentes II.



Fonte: PTI, 2023.

2.2 Coleta de amostras

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 17 de 92

As coletas de amostras foram divididas em duas fases. No primeiro período de coletas foram realizadas seis coletas bimestrais entre fevereiro de 2019 e fevereiro de 2020 a fim de contemplar as análises por *screening* e qualidade da água. Após finalização dessa etapa, realizaram mais sete coletas entre outubro de 2020 e setembro de 2022, para desenvolvimento dos métodos de quantificação e continuidade do monitoramento da qualidade da água. É importante lembrar que, nesse último período, enfrentou-se grande dificuldade para coleta das amostras devido ao isolamento imposto pela pandemia causada pelo vírus Sars-CoV-2, impossibilitando, inclusive, o acesso ao Paraguai. Apesar deste impedimento ter acarretado atraso das coletas inicialmente previstas, principalmente para a etapa do desenvolvimento dos métodos de quantificação, a entrega referente a coleta de amostras foi realizada com sucesso, com mais de 300 amostras de água coletadas ao longo das treze missões de campo.

Figura 4. Realização da coleta das amostras nos pontos selecionados no Brasil e Paraguai



Fonte: PTI, 2019.

2.3 Análises laboratoriais

Ao longo do convênio, foram realizadas mais de 109.000 análises laboratoriais entre o desenvolvimento dos métodos para identificação e quantificação de agrotóxicos, caracterização da assinatura química e análise de amostras de água superficial. O desenvolvimento de metodologia analítica necessita corpo técnico especializado, que foi contemplado com a contratação de pesquisadores, analistas e bolsistas, além da

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 18 de 92

participação dos professores voluntários. Cada etapa do projeto tem sua complexidade, que vai desde a preparação da campanha de campo, coleta em campo dentro dos critérios estabelecidos e análise das amostras com métodos devidamente validados. A seguir, apresentam-se as etapas desenvolvidas e os principais resultados obtidos.

2.3.1 Identificação de agrotóxico (*screening*)

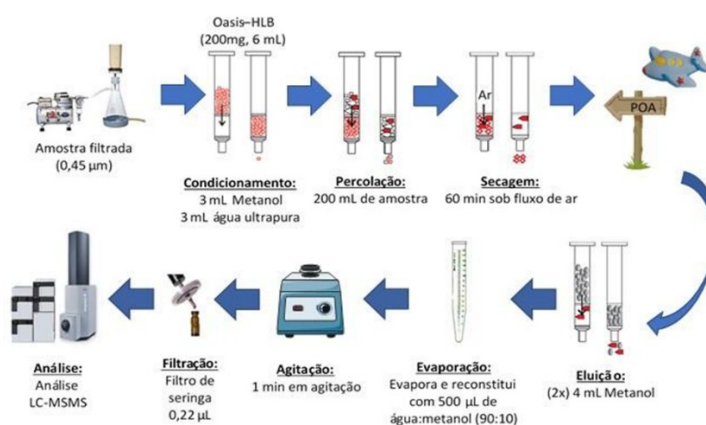
2.3.1.1 Banco de dados

Uma base de dados contendo informações de massa exata do composto e de fragmentos, de mais de 1600 pesticidas foi construída para a realização da análise *Screening* por UHPLC-QTOF MS, em ambos os modos de ionização, positivo e negativo. A base de dados contém informações de fórmula química, registro CAS, fragmentos característicos, modo de ionização, classificação do composto (herbicida, inseticida etc.), além de dados sobre a situação em termos de aprovado ou não aprovado na ANVISA (no mesmo link descrito anteriormente) e informações sobre o status de registro de produto no Paraguai, através do SENAVE (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas). A base de dados contendo todas as informações coletadas para auxiliar na análise qualitativa dos dados cromatográficos obtidos por UHPLC-QTOFMS estão disponíveis em [Base de Dados](#).

2.3.1.2 Metodologia de extração e análise cromatográfica

Para o *screening* de agrotóxicos em água (análise qualitativa), prevista na primeira parte deste convênio, empregando UHPLC-QTOF MS, a proposta de preparo de amostras segue o protocolo de extração em fase sólida apresentado a seguir.

Figura 5. Esquematização do processo de preparo de amostra por SPE para análise de agrotóxicos em água superficial por UHPLC-QTOF MS



Fonte: PTI, 2023.

O método cromatográfico proposto para as análises *screening* de agrotóxicos é um método baseado na metodologia proposta por HERNÁNDEZ et al. (2015). O equipamento utilizado é um UHPLC-QTOF MS (cromatógrafo a líquido do modelo Nexera 2 da Shimadzu e um espectrômetro de massa com analisador de

Relatório de Cumprimento do Objeto

massa híbrido: quadrupolo e tempo de voo da Bruker Daltonics, modelo Impact II), disponível no Laboratório de Técnicas Cromatográficas acopladas a espectrometria de massa do IQ-UFRGS. As condições de análise otimizadas estão disponíveis no método cromatográfico desenvolvido.

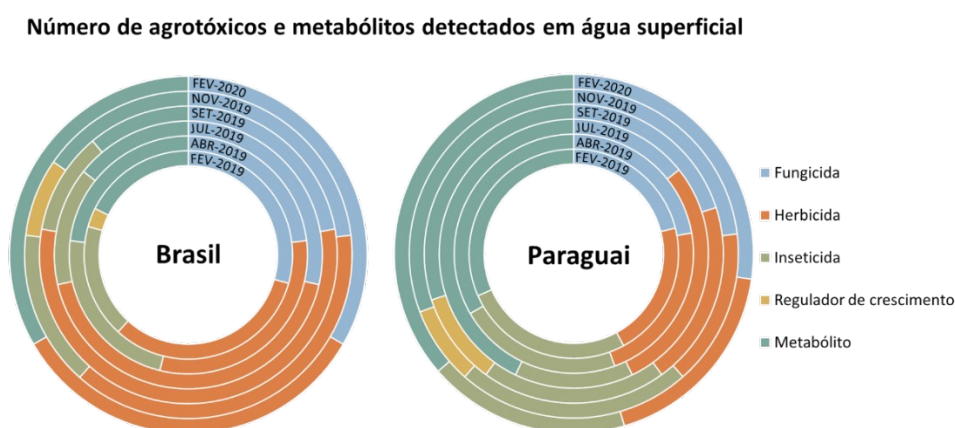
2.3.1.3 Principais resultados

Além de compostos da classe de agrotóxicos, foram detectados compostos de diversas outras classes como parabenos, plastificantes, surfactantes e compostos considerados de origem natural. A maioria desses compostos também são considerados micropoluentes mas, como o foco inicial deste trabalho foi a detecção de agrotóxicos em águas superficiais, tais compostos foram removidos.

Observou-se que exceto a primeira coleta em fevereiro de 2019, as demais apresentaram uma média de 11 compostos detectados no Brasil e 10 compostos no Paraguai, com alguns de ocorrência frequente em todas as campanhas. 43 pesticidas foram identificados de diferentes classes, sendo herbicida, fungicida e inseticida as classes mais identificadas. Destes 43 compostos, 36 foram identificados em rios localizados no Brasil e 28 em rios localizados no Paraguai, havendo 21 compostos que foram identificados em ambos os países. Compostos exclusivamente encontrados no Brasil foram: bentazone, dicamba, difenoconazole, flutriafol, haloxyfop, mepronil, metalaxyl, metolachlor, metolachlor-OXA, metolcarb, pirimiphos-methyl, propazine, propiconazole, simazine, and tetramethrin; e exclusivamente no Paraguai: clethodim sulfone, fipronil, fipronil-sulfide, pyrethrin 1, rotenone, tebuconazole, e tebufenozide.

Os compostos mais frequentemente detectados foram atrazina e seus metabólitos (desetilatrizona (DEA), 2-hidroxi-atrizona e desisopropilatrizona (DIA)) e, também, dinoterb e 8-hidroxiquinolina.

Figura 6. Número de compostos totais identificados como suspeitos e suas classes para as coletas realizadas entre fevereiro-2019 e fevereiro-2020



As frequências de detecção de tais compostos foram compiladas no digrama de calor da Figura 7. É possível observar a evidência quanto a ocorrência de atrazina e seus metabólitos, dinoterb e 8-hidroxiquinoline na maioria das campanhas realizadas e que o grupo A tende a ser o mais preservado pelo menor número de

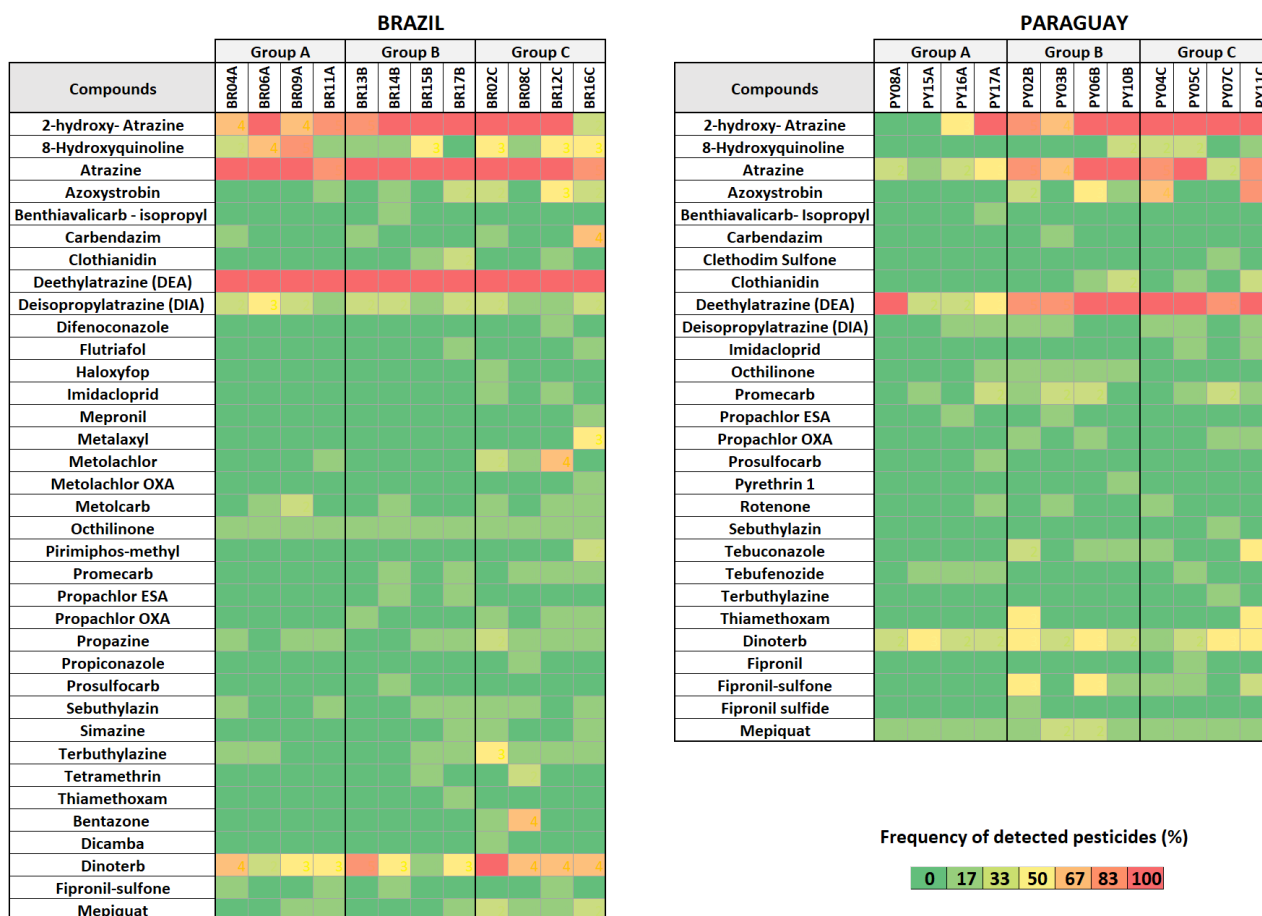
Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 20 de 92

compostos detectados. Aproximadamente 22% e 36% dos compostos detectados no Brasil e Paraguai, respectivamente, tiveram ocorrência única no período de monitoramento.

O número de compostos detectados em águas superficiais reflete o uso desse tipo de produto em ambos os países. Segundo o Pannel de Informações de Agrotóxico do IBAMA, existem 4700 produtos comerciais registrados para uso no Brasil. No Paraguai são mais de 4100 produtos comerciais com registro vigente ou definitivo segundo o *Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas* (SENAVE). De acordo com dados da FAO, o consumo de agrotóxicos no Brasil foi de 5,94 kg/ha para 2019 e 2020, enquanto no Paraguai foi 4,68 kg/ha e 4,18 kg/ha em 2019 e 2020, respectivamente (FAO, 2022). Em relação a permissão de utilização como fitossanitários em ambos os países, 50% dos compostos têm uso aprovado no Brasil e 29% no Paraguai (somando os de classificação vigente e definitivo). Os compostos não regulamentados para uso agrícola foram 25% e 37% no Brasil e Paraguai respectivamente.

Figura 7. Compostos identificados em águas superficiais do Brasil e Paraguai usando a metodologia de *screening*. O gradiente de cor representa a frequência que cada composto identificado nas seis campanhas amostrais realizadas entre 2019 e 2020



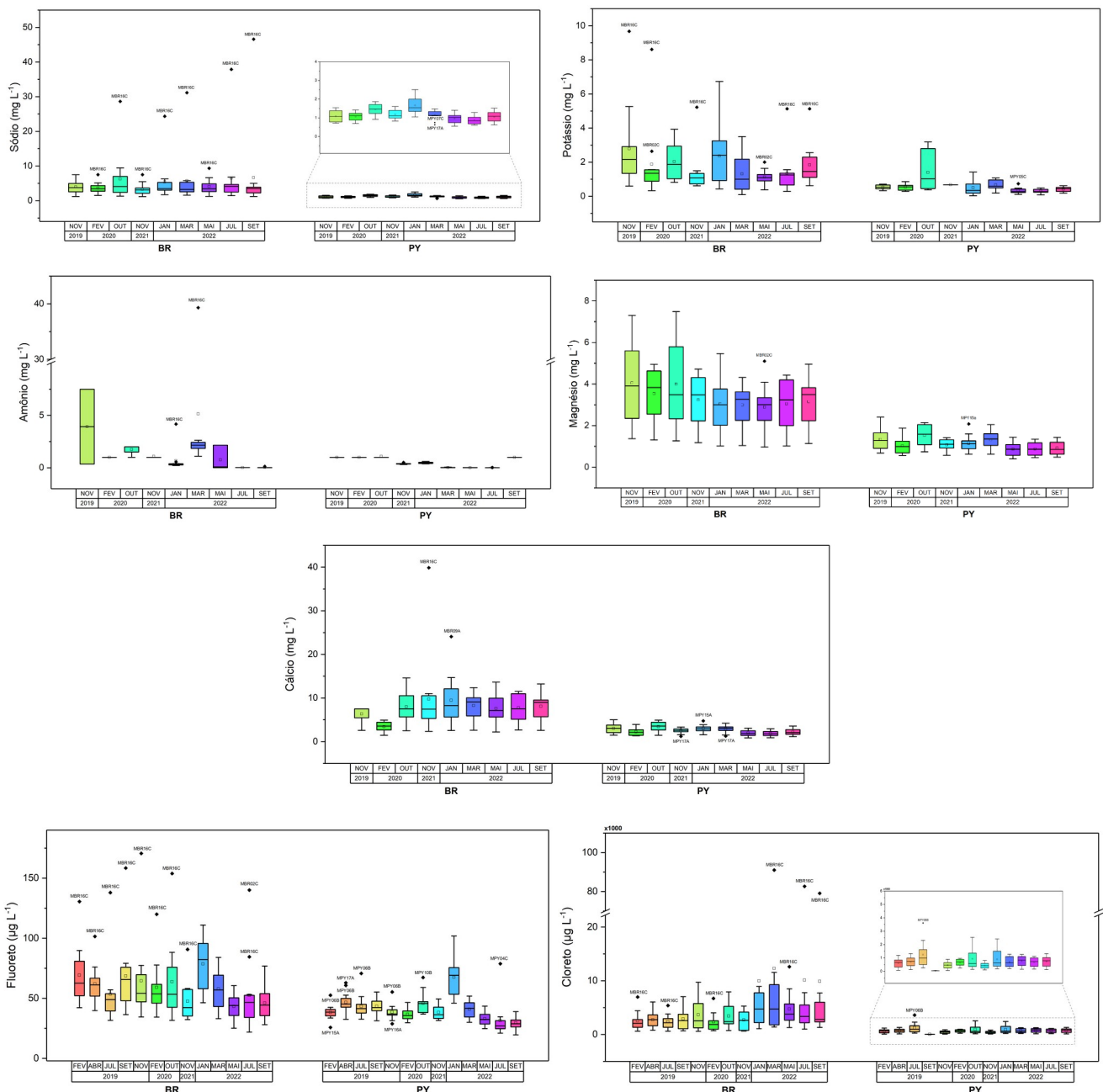
Fonte: PTI, 2020.

Figura 8. Porcentagem de compostos classificados como permitidos para usos em ambos os países estudados

Relatório de Cumprimento do Objeto

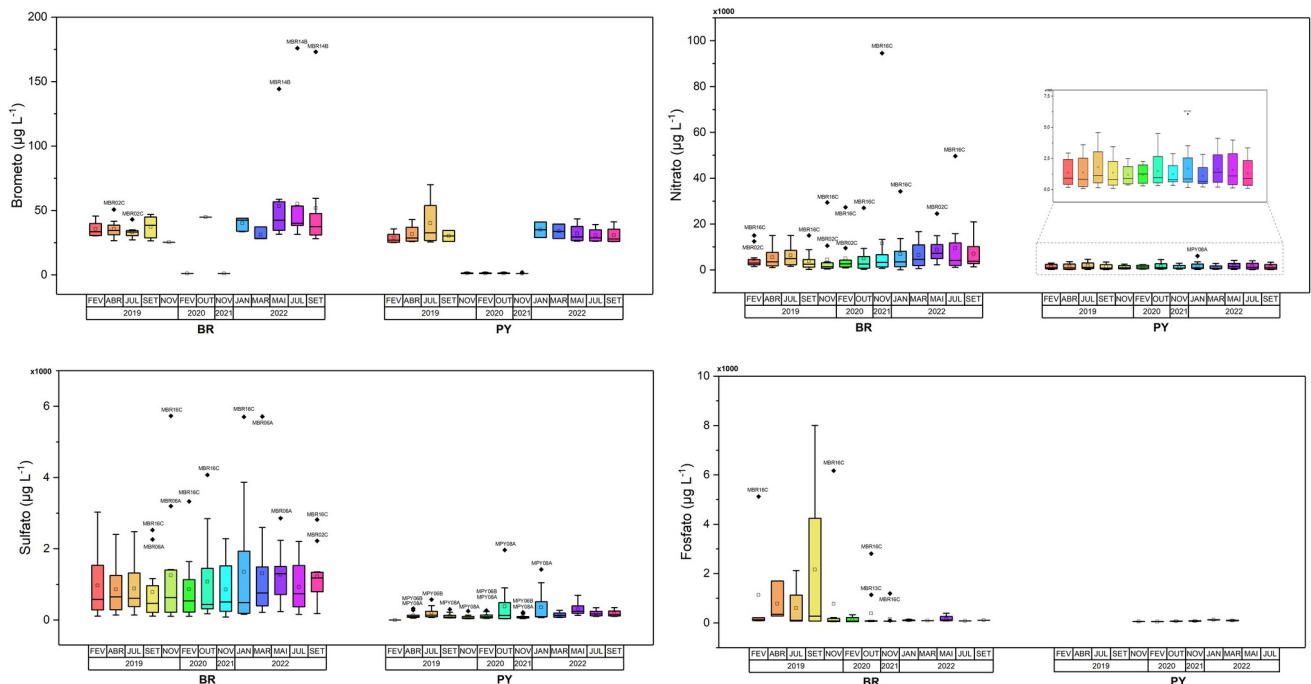
ácido aminometilfosfônico (AMPA) em água superficial. Os dados gerados foram compilados na forma de box plots para uma análise visual da dispersão dos dados e indicação de outliers (amostras discrepantes). Glifosato e AMPA não foram quantificados em nenhuma amostra analisada ao longo do projeto empregando esse método. Apenas na campanha de julho de 2019, glifosato foi detectado abaixo do limite de detecção no ponto MBR17.

Figura 9. Box-plots para os parâmetros estimados por cromatografia de íons (íons dissolvidos) para as campanhas de campo realizadas entre 2019 e 2022 nos pontos selecionados no Brasil e Paraguai



Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 23 de 92



Nota: as análises de cátions foram iniciadas em novembro de 2019.

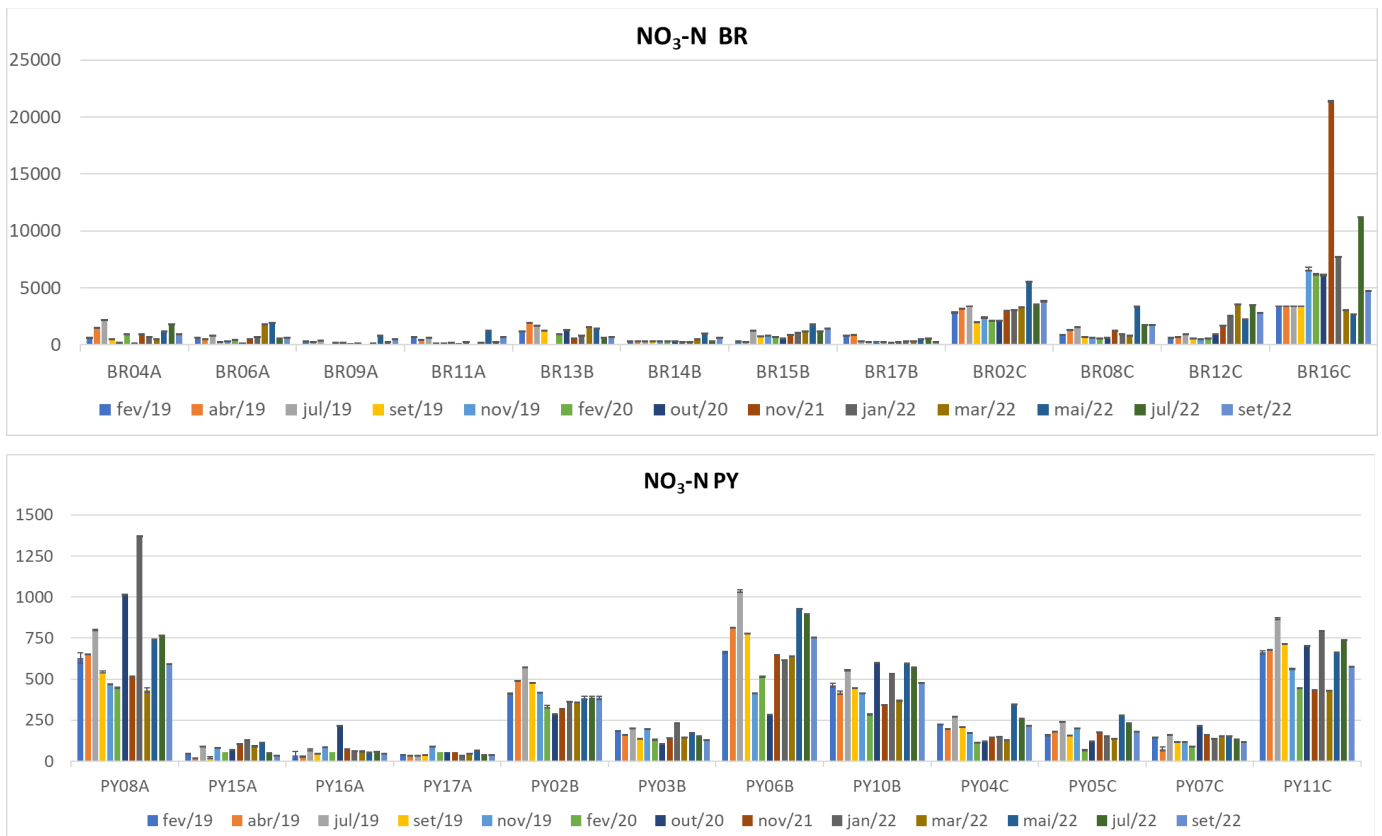
Fonte: PTI, 2023.

As frações inorgânicas do nitrogênio que comumente ocorrem são os íons amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). As duas primeiras são formas reduzidas e as duas últimas, oxidadas. O íon amônio não é tóxico e não causa problemas para os organismos, mas pode indicar contaminação por fontes antropogênicas como lançamento de esgoto industrial e doméstico ou a lixiviação de fertilizantes agrícolas. Como o íon amônio está em equilíbrio com a amônia ($\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$), dependendo do pH e temperatura, o equilíbrio pode estar deslocado no sentido da produção de amônia. Isso ocorre preferencialmente quando pH é básico (acima de 8,0) e em altas temperaturas e pode ser tóxica aos organismos aquáticos (Sawyer, 2008). Das amostras analisadas, o MBR16 foi a amostra que apresentou as principais detecções de amônio e as maiores concentrações (até $39,3 \text{ mg L}^{-1}$). O nitrito foi identificado em 34 ocorrências no Brasil, sendo onipresente em MBR16, enquanto no Paraguai em 2 ocorrências. As concentrações determinadas foram entre $50,34$ e $3997,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, sendo nos meses de setembro e novembro de 2019 as concentrações em MBR16 superiores ao legislado para esse parâmetro ($1,0 \text{ mg/L NO}_2\text{-N}$). A determinação das formas reduzidas de nitrogênio (amônio e nitrito) indicam que a fonte de poluição próximo do local de amostragem. Por sua vez, a presença do nitrato em águas naturais é resultado do lançamento de efluentes e da lixiviação de solos. Neste último, devido à predominância de cargas negativas no solo, especialmente nas camadas superficiais dos solos tropicais, o NO_3^- pouco interage com o solo, podendo atingir águas superficiais e lençol freático (SILVA et al., 2010). Os nitratos são tóxicos, causando uma doença chamada metahemoglobinemia infantil, que é letal para crianças (o nitrato reduz-se a nitrito na corrente sanguínea, competindo com o oxigênio livre, tornando o sangue azul) (CETESB, 2019). O nitrato foi identificado em todos os pontos, sendo as concentrações no Brasil maiores que no Paraguai e, ainda, é possível verificar um leve aumento na concentração estimada no Brasil no último ano

Relatório de Cumprimento do Objeto

monitorado. Os pontos MBR02C e MBR16C foram que apresentaram as maiores concentrações dessa espécie, ultrapassando em duas ocorrências o máximo estabelecido pela CONAMA 357/2005 de 10 mg L⁻¹ de NO₃-N (Figura 10).

Figura 10. Concentrações de NO₃-N estimadas nas amostras coletadas no Brasil e Paraguai



Fonte: PTI, 2023.

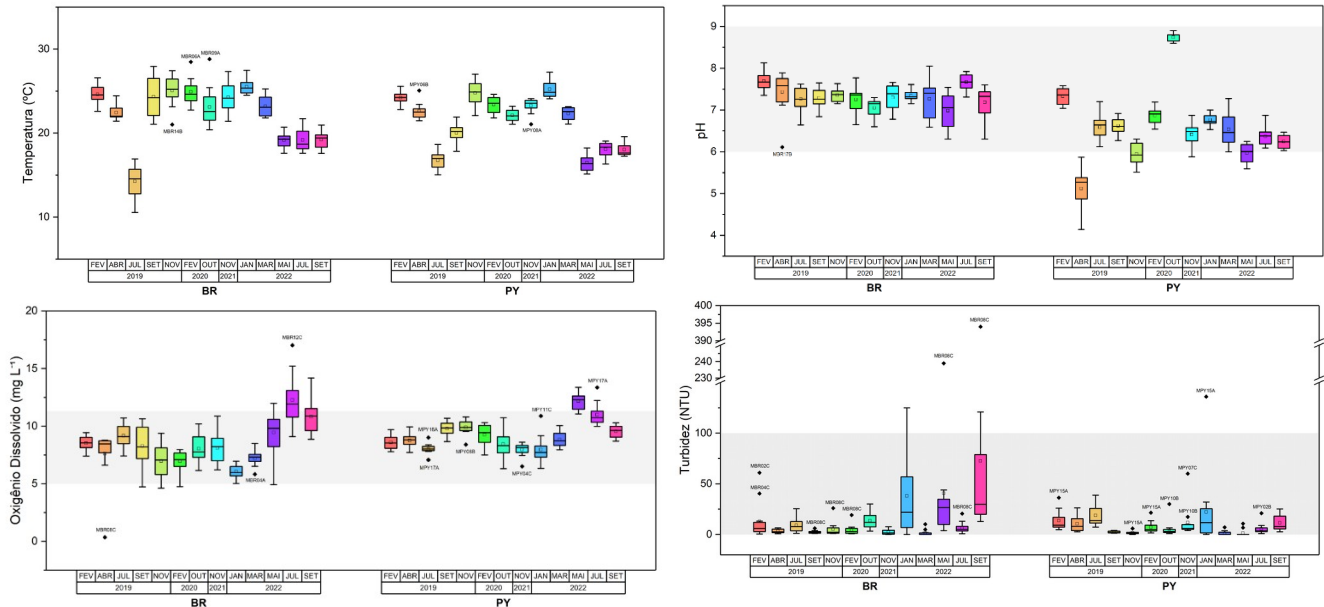
Os íons sódio, cloreto, sulfato, cálcio, potássio e magnésio, ocorrem naturalmente no meio como um processo de intemperismo das rochas e sua concentração é altamente variável. Altas concentrações desses elementos nas águas superficiais estão normalmente relacionados com a lançamento de esgoto doméstico, efluentes industriais e agrícolas, podendo ter um impacto significativo no aumento da salinidade das fontes de água superficial (Steele e Aitkenhead-Peterson, 2011; Skowron et al., 2018; Zak et al., 2021).

2.3.2.2 Sonda multiparamétrica

Todos os parâmetros estimados em campo entre fevereiro/2019 e setembro/2022 através da sonda Horiba foram compilados nos gráficos box-plot para uma análise visual da dispersão dos dados e indicação de outliers (amostras discrepantes). Todos os dados da sonda obtidos para os sete parâmetros estão disponíveis no NITdocs bem como o panorama geral da discussão dos resultados.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Figura 11. Box-plots para os parâmetros coletados em campo com sonda multiparamétrica entre 2019 e 2022 nos pontos selecionados no Brasil e Paraguai.



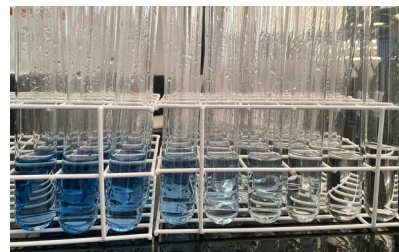
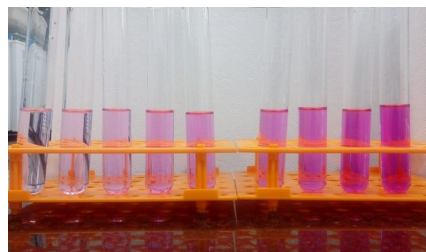
Fonte: PTI, 2020.

Os limites estabelecidos na resolução CONAMA 357/2005 e na Resolución 222/2002 que dispõem da classificação dos corpos aquáticos e condições para a qualidade da água no Brasil e Paraguai respectivamente, foram incluídos nas figuras para indicar ocasiões fora de tais limites

2.3.2.3 Nitrogênio e Fósforo Total

Os métodos para determinação de nitrogênio e fósforo foram desenvolvidos no projeto (POP FQ 14 e 15). No início do convênio houve um atraso na entrega dessa análise devido a problemas de compatibilização do tamanho do cádmio utilizado na etapa de redução de nitrato a nitrito, antes da reação colorimétrica. Após contornar esse problema, as amostras foram descongeladas para analisar fósforo e nitrogênio simultaneamente, da primeira fase de coletas do convênio. Mais recentemente, outro problema com a análise de nitrogênio foi verificado, sendo a presença de nitrato verificada nas amostras em branco (apenas água ultrapura). Após inúmeras intervenções no procedimento de análise, a curva de calibração foi produzida em água reagente (Sigma). Os resultados da segunda fase coletas puderam então ser finalizados.

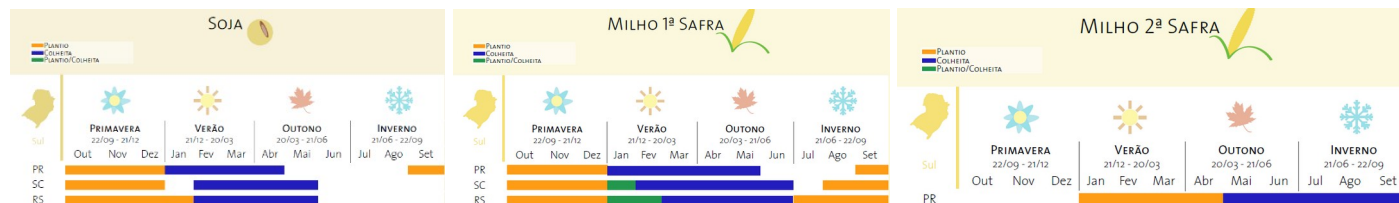
Figura 12. Curvas analíticas para determinação de nitrogênio (esquerda) e fósforo (direita)



Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 27 de 92

Figura 14. Calendário de Plantio e Colheita de soja e milho 2ª safra para a região sul do Brasil



Fonte: CONAB, 2019.

No caso do Fósforo total, a sua presença em águas naturais se deve principalmente ao lançamento de efluentes domésticos e industriais como os de indústrias de fertilizantes, agrotóxicos, alimentícias, abatedouros, entre outros. Águas provenientes da drenagem em áreas agrícolas e urbanas também aparecem como fontes de fósforo em águas superficiais (CETESB, 2019). Estes dados também podem ser confrontados com o levantamento da carga poluente na BP3. Para os pontos MBR02C (Marechal Cândido Rondon) e MBR16C (Medianeira) a carga de DBO dos esgotos domésticos de 2000 a 6000 kg por dia, sendo que neste último município, mais da metade do esgoto gerado não é coletado nem tratado. Mapas correlacionando os dados físico-químicos bem como screening das amostras de água foram confeccionados para uma melhor visualização dos resultados nas microbacias estudadas no projeto Micropoluentes II.

2.3.3 Métodos de quantificação de agrotóxicos

As condições hidroquímicas e as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos refletem na dinâmica, adsorção, biodisponibilidade e destino no ambiente. Para um estudo de monitoramento de contaminação por agrotóxico é relevante além da sua identificação, a quantificação desses poluentes no ambiente. A cromatografia, juntamente com preparo de amostra adequado, representa a técnica mais relevante e confiável para análise destas substâncias em matrizes complexas, sendo primordial o desenvolvimento de métodos analíticos multirresíduos perante a diversidade de agrotóxicos empregados na agricultura.

Diante das proporções territoriais e hidrográficas do Brasil e Paraguai, estudos dessa natureza ainda são escassos e requerem grande quantidade de investimento. Dessa forma, o estudo realizado nesse projeto pode ser considerado pioneiro na região e certamente contribui com o levantamento mundial de contaminantes de preocupação emergente e programas de fiscalização, visando a proteção da saúde e do meio ambiente.

O levantamento dos compostos foi baseado na análise *screening* e dados de levantamentos anteriores realizados na região (Della-Flora et al., 2019). Alguns compostos identificados pelo *screening* não puderam ser adquiridos devido a não comercialização no país ou a restrição de acesso a substância. Ainda, durante a vigência desse convênio, houve a aquisição e instalação de dois cromatógrafos (GC-MS/MS e LC-MS/MS) pela Itaipu no início de 2021 os quais ampliaram o poder de determinação de espécies orgânicas.

2.3.3.1 Determinação de Atrazina e metabólitos em água por GC-MS

Inicialmente, apenas o equipamento GC-MS (Thermo Scientific) e padrões de atrazina e seus metabólitos

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 28 de 92

estavam disponíveis para o desenvolvimento das quantificações dos agrotóxicos. Apesar dessa etapa estar prevista para a segunda metade do projeto, diante da necessidade de valores quantificados de agrotóxicos nos riachos selecionados para correlação com dados de biodiversidade aquática levantada, desenvolveu-se a extração e determinação de atrazina (ATZ), desisopropilatrizona (DIA) e desetilatrizona (DEA) a partir de adaptações no método previamente desenvolvido no projeto Micropoluentes I. As otimizações realizadas durante o desenvolvimento do método de extração em fase sólida (SPE) e de determinação empregando o modo SIM (*single ion monitoring*) no GC-MS estão descritas com detalhe no Nitdocs e resumidas na Figura 15.

Figura 15. Processo de preparo de amostra por SPE para análise de atrazina e metabólitos em água superficial por GC-MS



Fonte: PTI, 2020.

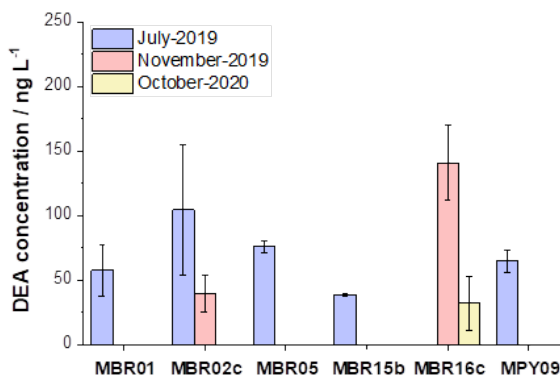
Os limites de quantificação (LOQ) foram 25 ng L⁻¹ para DEA apenas em BR e 50 ng L⁻¹ para outros compostos em BR e para todos os compostos em PY. A recuperação variou de 86,9 a 122%, com desvio padrão relativo entre 3 e 21%.

Com o método validado, foi possível realizar a determinação de atrazina e metabólitos em três campanhas de coleta (julho e novembro de 2019, compatível com coletas da Meta 3, e outubro de 2020). Os resultados obtidos para a quantificação de ATZ, DIA e DEA estão mostrados na Figura 16 para as amostras do Brasil e Paraguai, na qual observa-se a ocorrência de ATZ e DEA enquanto DIA não foi detectado em nenhuma amostra coletada no Brasil e Paraguai.

Figura 16. Resultados obtidos das amostras do Brasil das campanhas para análise de ATZ, DIA e DEA por GC-MS (Thermo)

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 29 de 92



Fonte: PTI, 2020.

DEA foi quantificado em 7 ocorrências em diferentes campanhas, variando de 31,8 a 140,5 ng L⁻¹. A maior concentração foi detectada no MBR16c em novembro de 2019. Além disso, foi detectado abaixo do LOQ nas amostras de julho de 2019 (MBR12c, MBR16c, MBR17b, MPY06 e MPY10b) e nas amostras de novembro de 2019 (MBR17b). As relações com o transporte de sedimentos influenciam os resultados nos pontos de amostragem MPY10, com um evento de aterro recente e MPY06 localizado a jusante de um reservatório artificial. ATZ só foi encontrado abaixo do LOQ (50 ng L⁻¹) nas amostras de novembro de 2019 (MPY10b) e em outubro de 2020 (MBR14b). Esses resultados coincidiram com o período de cultivo do milho na região. Embora a análise de *screening* tenha confirmado a presença desses compostos, a concentração deve ser inferior aos limites de detecção alcançados pela técnica de quantificação. Esses limites também cumprem os limites regulatórios para águas doces no Paraguai (3.000 ng L⁻¹) e no Brasil (2.000 ng L⁻¹). De acordo com as propriedades físico-químicas da ATZ e de seus metabólitos, o processo de degradação da ATZ aumenta a solubilidade e a polaridade dos compostos recém-formados. ATZ tem solubilidade máxima em água de 33 mg L⁻¹, enquanto 3200 mg L⁻¹ para DEA, e 670 mg L⁻¹ para DIA, apresentando maior mobilidade que ATZ em água. Além disso, a meia-vida ($t_{1/2}$) do DEA, 52 dias, é maior que a do DIA, 36 dias.

Esses compostos foram incluídos nas próximas metodologias desenvolvidas para multirresíduos de agrotóxicos em água superficial.

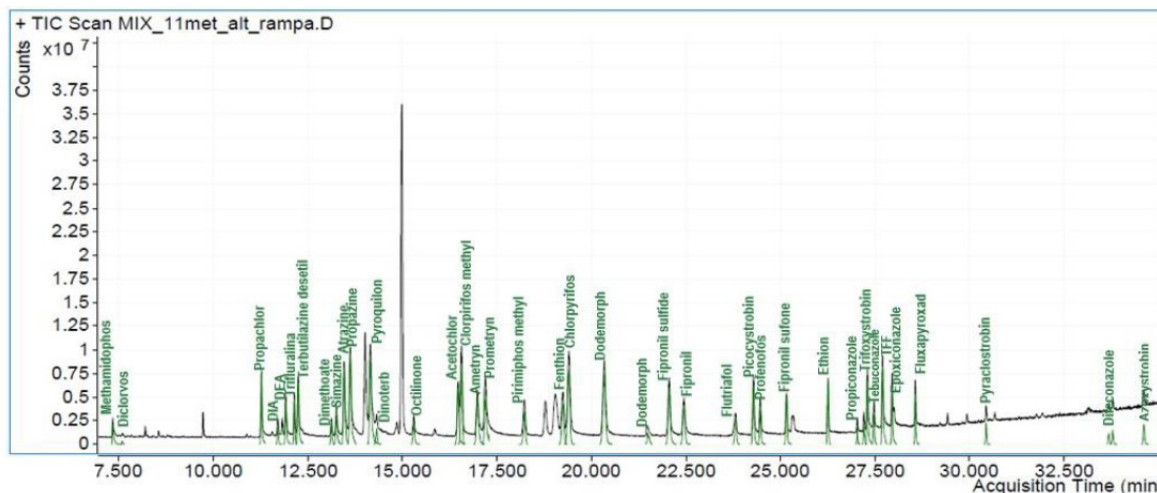
2.3.3.2 Determinação multirresíduo de pesticidas por GC-MS/MS

A partir da instalação do GC-MS/MS (Agilent) o método cromatográfico multirresíduo foi inicialmente desenvolvido utilizando 38 compostos e adaptações a partir de Tankiewicz e Biziuk (2018). A Figura 17 mostra a separação obtida para determinar a maior quantidade de compostos em uma única corrida cromatográfica.

Figura 17. Cromatograma obtido para a separação de 40 compostos e padrão interno de trifenilfosfato obtidos no GC-MS/MS

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 30 de 92



Fonte: PTI, 2020.

Para os testes de extração, a técnica por SPE foi selecionada pois permite a extração simultânea de diversas substâncias e já está bem consolidado na literatura. Foram utilizados de três marcas de cartuchos, sendo elas: 1 - Waters - Oasis HLB 6cc de 200 mg/6 mL; 2 - Supelco - Select HLB SPE de 200 mg/6 mL; 3 - Phenomenex - Strata X 33µm de 200 mg/6 mL e inicialmente verificou-se a possibilidade de uma única etapa de extração para análise em dois equipamentos (GC e LC-MS/MS). Entretanto, as condições de extração não convergiram para o uso dos mesmos solvente e então foram tratadas individualmente para definição do cartucho. As condições de solvente e pH avaliadas estão com detalhes no Nitdocs. O melhor cartucho foi o Oasis HLB (200 mg) com amostra mais próxima do pH natural, solventes de condicionamento diclorometano e água ultrapura e solvente de eluição diclorometano. Após a seleção do cartucho e as condições, o POP GC 06 foi elaborado e está disponível no capítulo de Procedimento Operacional Padrão - POP, Equipamento - Cromatografia Gasosa.

O método desenvolvido foi validado segundo critérios adotados pelo INMETRO e a partir de um pool contendo todos os pontos de amostragem coletados na campanha de março de 2022 separado para cada país. Essa necessidade da separação das matrizes para validação por país se deu em virtude ao modo de coleta do projeto, já que as amostras do Brasil e Paraguai são realizadas em períodos diferentes e de que cada país possui características físico-químicas distintas como puderam ser observadas na caracterização das amostras e na etapa de análise de atrazina e metabólitos. A etapa de validação da metodologia SPE-GC-MS/MS segundo critérios aceitos por agências reguladoras é extremamente importante para conferir maior credibilidade ao dado gerado e garantir o critério analítico, principalmente considerando a sensibilidade dos dados. A faixa de concentração para determinação dos analitos variou entre 5 e 175 ng L⁻¹, com coeficientes de correlação entre 0,9807 e 0,9999. Os limites de quantificação variaram 5 e 50 ng L⁻¹ e as recuperações entre 72,85 e 130,29%. Para a precisão avaliada, desvios padrão relativos foram obtidos na faixa de 0,49 e 40,36%. Foram realizados também ensaios de robustez para verificar alteração na quantificação ante pequenas variações das variáveis relacionadas a extração e determinação cromatográfica, sendo que a maioria dos analitos pode ser determinada sem a influência dessas variações, caracterizando um método robusto. Assim, o método validado foi considerado adequado para a determinação dos agrotóxicos e alguns

Relatório de Cumprimento do Objeto

metabólitos da Tabela 3.

Tabela 3. Compostos monitorados com base no método desenvolvido por SPE-GC-MS/MS

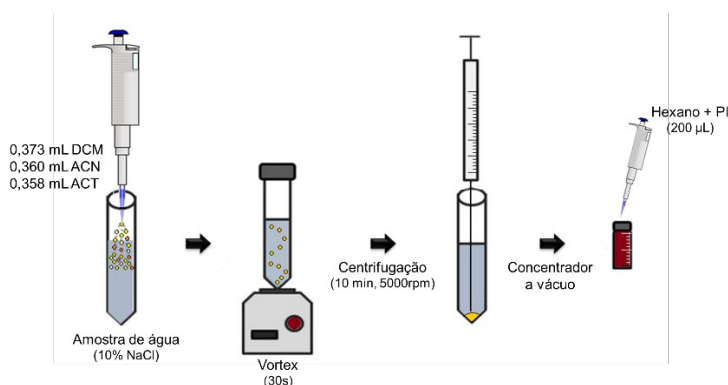
Compostos monitorados por SPE-GC-MS/MS				
Herbicida	Inseticida	Fungicida	Metabólitos/ Produtos de degradação	Outros**
Acetoclor	Clorpirifós	Clorotalonil	Desetilatrazina	Nicotina
Ametrina	Clorpirifós-metil	Ciproconazol	Deisopropilatrazina	
Atrazina	Dimetoato	Difeconazol (BR)*	Fipronil-sulfeto	
Metolaclor	Etion	Dodemorf	Fipronil-sulfona	
Prometrina	Fention	Epoxiconazol	Terbutilazina-desetil	
Propazina	Fipronil	Flutriafol		
Propaclor	Malation	Fluxaproxad (BR)		
Simazina	Paration-metil	Propiconazol		
Terbutilazina	Pirimifós-metil	Picoxistrobina (BR)		
Trifluralina	Profenofós	Piraclostrobina (BR)		
		Piroquilon		
		Tebuconazol		
		Trifloxistrobina		

*os compostos sinalizados com (BR) puderam ser quantificados apenas nas amostras brasileiras

**a nicotina é um composto de uso social considerada como traçador de atividade antrópica

Outra técnica de extração também foi testada, principalmente para verificar a melhora na extração de alguns compostos. O método de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês Dispersive liquid-liquid microextraction) é uma técnica de extração e pré-concentração miniaturizada que apresenta como vantagens simplicidade, baixo custo e baixo consumo de reagentes quando comparada a outras técnicas, como a SPE. Para os testes de extração, inicialmente foram testados algumas combinações de solventes de extração e dispersão. Observou-se que as melhores condições de extração foram observadas para o teste com mistura de solventes dispersores (acetonitrila e acetona). A partir disso, empregou-se um planejamento de misturas para otimização da melhor condição de extração simultânea os agrotóxicos e metabólitos. Após a avaliação dos resultados obtidos no planejamento de misturas Simplex Lattice Pseudocomponentes, os valores otimizados para os solventes extrator de diclorometano (DCM) e dos dispersores acetonitrila (ACN) e acetona (ACT) foram 0,373 mL, 0,360 mL e 0,358 mL, respectivamente. O procedimento operacional POP_GC07 documenta o procedimento adotado, que está resumido na Figura 18.

Figura 18. Procedimento de preparo de amostra empregando DLLME



Fonte: PTI, 2020.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Da mesma forma que no método SPE, o método empregando extração DLLME também passou pela etapa de validação segundo os parâmetros já descritos. A faixa de concentração para determinação dos analitos variou entre 0,025 e 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficientes de correlação entre 0,9987 e 0,9999. Os limites de quantificação variaram 0,025 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as recuperações entre 84,98 e 131,90%. Para a precisão avaliada, desvios padrão relativos foram obtidos na faixa de 0,33 e 24,19%. Foram realizados também ensaios de robustez e constatou-se que, para alguns compostos, os parâmetros da metodologia como tempo de centrifugação e modo de secagem por exemplo, devem ser bem controlados para manter uma recuperação adequada do analito. Assim, o método validado foi considerado adequado para a determinação dos mesmos agrotóxicos e metabólitos da Tabela 3. É relevante mencionar que, apenas para a piraclostrobina não foi possível determinar em ambos os países utilizando DLLME-GC-MS/MS.

As amostras coletadas a partir de novembro de 2021 até setembro de 2022 foram submetidas ao método SPE-GC-MS/MS e DLLME-GC-MS/MS. Nos pontos em que a concentração desses compostos ultrapassou o limite por SPE (concentração adotada como estimativa apenas) foram consideradas as concentrações obtidas por DLLME (faixa superior de concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$) para considerar o valor de concentração na faixa adequada de quantificação.

A maioria dos compostos não foram detectados e quantificados nas amostras de água coletadas. 12 compostos foram encontrados nas amostras do Brasil e 11 nas amostras do Paraguai. Os compostos fention (BR), epoxiconazol (PY), propazina (PY), simazina (PY), tebuconazol (PY) e terbutilazina (PY) foram quantificados em uma única ocorrência (Figura 19, Tabela 4). Apesar da proximidade no número de poluentes, as concentrações encontradas nas amostras brasileiras foram bastante superiores as paraguaias. As concentrações de todos os compostos quantificados, mesmo que uma única vez, estão mostrados na Figura 19.

Tabela 4. Resumo da ocorrência de agrotóxicos e metabólitos em águas superficiais do Brasil e Paraguai

Compostos	País	LOQ (ng L^{-1})	Concentração máxima permitida* (ng L^{-1})	Concentração Máxima (ng L^{-1})	Concentração Mínima (ng L^{-1})	Concentração Média (ng L^{-1})	Número de amostras positivas	Frequência (%)
Atrazina	BR	5	2000	497,2	13,9	188,5	14	19
	PY		3000	3188,4	9,1	507,8	13	18
Clorotanolil	PY	10	-	225,2	114,8	151,6	2	3
Clorpirifos	BR	5	-	5,4	5,1	5,2	2	3
Desetilatrazina	BR	5	-	341,2	5,2	148,9	57	77
	PY		-	130,9	5,8	38,6	21	29
Deisopropilatrazina	BR	50	-	300,6	32,6	120,4	9	12
	PY	10	-	75,9	12,7	28,7	11	15
Epoxiconazol	BR	5	-	6,0	5,1	5,5	2	3
	PY	10	-	83,6	-	-	1	1
Fenthion	BR	10	-	17,2	-	-	1	1
Fluxapyroxad	BR	10	-	15,6	10,0	12,5	4	5
Metolaclor	BR	10	10000	5294,2	11,0	537,0	65	88
	PY	5	-	105,3	5,6	34,4	31	43
Nicotina	BR	10	-	241,4	12,0	63,0	22	30
	PY	5	-	12,6	6,3	8,4	6	8

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 33 de 92

Propazina	PY	10	-	41,0	-	-	1	1
Propiconazole I e II	BR	10	-	22,0	17,4	19,7	4	3
Simazina	PY	5	4000	168,1	168,1	168,1	1	1
Tebuconazole	PY	10	-	14,9	-	-	1	1
Terbutilazina	PY	10	-	81,6	-	-	1	1
Terbutilazina-desetil	BR	25	-	33,0	31,4	32,2	2	3

*valores da resolução CONAMA 357/2005 e na Resolución 222/2002 que dispõem das condições para a qualidade da água no Brasil e Paraguai.

**esse composto foi removido da lista de autorizadas pela ANVISA de acordo com a Resolução - RE Nº 1.967, DE 18 DE JULHO DE 2019 pela ausência de produtos com registro válido;

***o S-metolaclor é permitido para o uso no Brasil pela Anvisa enquanto o metolaclor foi removido de acordo com a Resolução - RE Nº 1.967

Fonte: PTI, 2020.

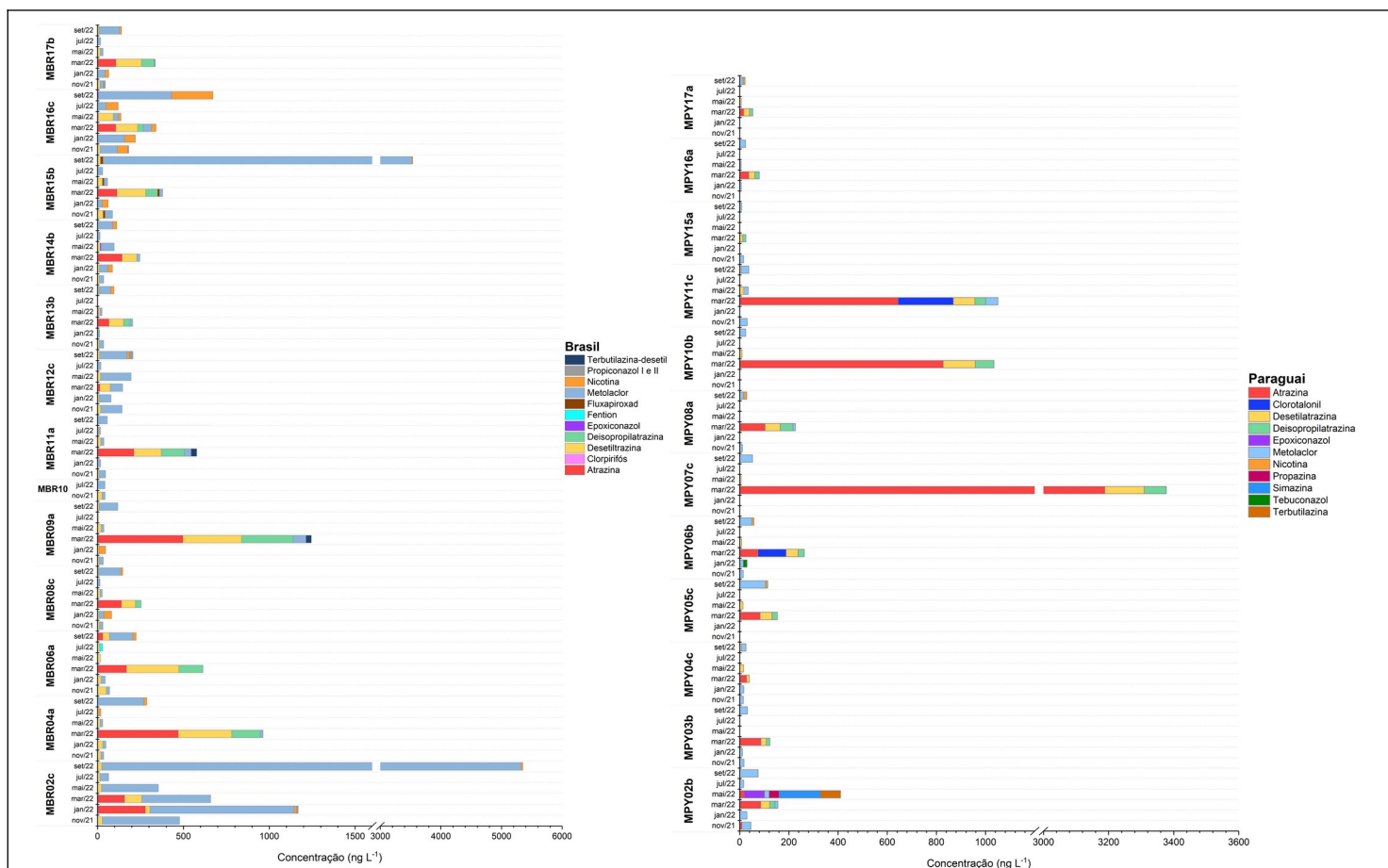
Dentre os pontos amostrados no Brasil, MBR02c (setembro-2022) apresentou a maior concentração de agrotóxicos monitorados, seguido MBR15b (setembro-2022), MBR09a (março-2022) e MBR02c (janeiro-2022) com o somatório de agrotóxicos acima de 1000 ng L⁻¹ (1 µg L⁻¹). MBR02c está localizada na microbacia do rio Arroio Fundo (Marechal Candido Rondon) e quase 56% da área é utilizada para agricultura. De forma similar, MBR15b apresenta 63,6% do seu território utilizado para atividade agrícola está situado na microbacia do rio Laranjita (São Miguel do Iguaçu, bacia Ocoí). Por outro lado, MBR09a (microbacia alto Rio Branco, bacia Ocoí), que também apresentou alta contaminação, havia sido considerado um local de baixo impacto antrópico, mas apresenta 68,1% do território coberto por pastagens. Segundo dados do Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná – SIAGRO (ADAPAR, 2022), os municípios de São Miguel do Iguaçu, Marechal Candido Rondon e Medianeira tiveram a comercialização de 1.639,5, 666,6 e 644,9 toneladas de ingredientes ativo em 2022, respectivamente.

Em geral, os meses de março-2022 e setembro-2022 foram os que apresentaram as maiores concentrações totais de agrotóxicos e metabólitos no Brasil. Em especial no mês de março, atrazina e seus metabólitos foram encontrados em maiores concentrações além de metolaclor em MBR02c, enquanto em setembro, a contribuição majoritária foi de metolaclor. As amostras coletadas em julho-2022 apresentaram as menores concentrações quantificadas para a maioria dos pontos (de 0 (MBR13b) a 58,23 ng L⁻¹), exceto MBR02c (64,59 ng L⁻¹) e MBR16c (120,26 ng L⁻¹). Em 60% das amostras brasileiras as concentrações determinadas estiveram abaixo de 100 ng L⁻¹.

Figura 19. Concentrações dos agrotóxicos e metabólitos em amostras de água superficial coletadas no Brasil e Paraguai entre 2021 e 2022.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 34 de 92



Fonte: PTI, 2020.

Para as amostras paraguaias MPY07c, MPY10b e MPY11c, todos na coleta realizada em março-2022, foram superiores a 1000 ng L⁻¹. Esses locais foram inicialmente considerados com impacto antrópico de médio a alto, sendo majoritariamente usados para atividades agrícolas (de 73,5 a 83,6%).

86% das amostras paraguaias apresentaram concentração total de poluentes inferior a 100 ng L⁻¹. Considerando o total de pontos amostrados nas 6 campanhas realizadas, 36% das amostras paraguaias não apresentaram nenhum composto monitorado. No mês de julho-2022 todas as amostras foram negativas para a presença de agrotóxicos e metabólitos exceto MPY02b, no qual foi detectado metolaclor em baixa concentração

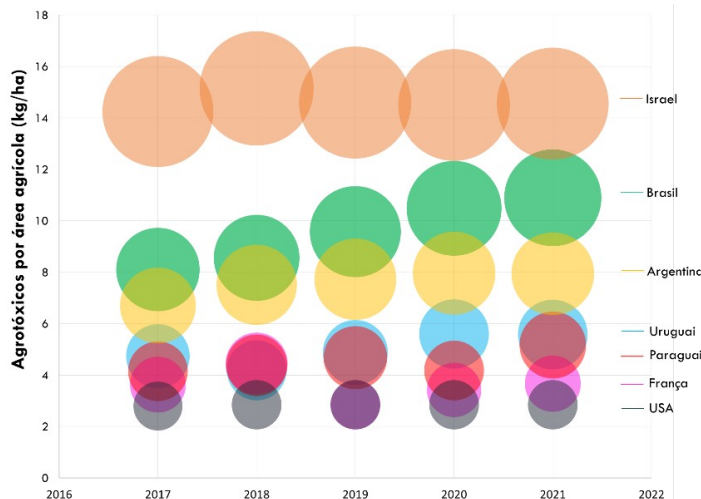
(16,23 ng L⁻¹). Entre os pontos com menores contaminações de poluentes, estão os pontos MPY15, MPY16 e MPY17. Embora MPY16a e MPY17a sejam microbacias essencialmente agrícolas (61 a 84,2%, respectivamente, sendo a última o local com a maior porcentagem entre as microbacias avaliadas), os pontos de coleta estão localizados dentro das reservas nos arroyos Limoy e Yvyty Rokai. Em MPY15a (Arroyo Syi), a porcentagem de cobertura florestal na microbacia é bastante superior (78%) e os resultados similares a MPY16a e MPY17a.

Comparando os dois países monitorados (Figura 20), o Brasil apresenta consumo de agrotóxicos bastante superior a Paraguai devido sua extensão territorial agrícola e isso impacta diretamente nos valores observados para os compostos encontrados até o momento. Apesar disso, em ambos os países pode ser observado um

Relatório de Cumprimento do Objeto

aumento na aplicação de agrotóxicos nos últimos anos, que acompanham o aumento das safras a cada ano.

Figura 20. Quantidade de agrotóxicos utilizados por área agrícola no Brasil, Paraguai e outros países.



Fonte: Elaboração PTI, 2023; fonte de dados FAO, 2023.

Do total de 146 amostras, 119 (81,5%) apresentaram a ocorrência de pelo menos um resíduo e agrotóxico ou metabólito; destas, em 85 amostras (71,4%) foram encontrados 2 ou mais compostos simultaneamente, com um máximo de 5 (BR) e 6 (PY) compostos na mesma amostra. A presença simultânea de diversos resíduos de poluentes não está prevista nas legislações de referência e não existe um valor máximo permitido (VMP) para o somatório de resíduos. Na comunidade europeia (EC, 2018), por sua vez, o máximo permitido para a concentração total de agrotóxicos (soma de todas as moléculas detectadas e quantificadas) em água é de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, esse limite não foi estabelecido com base em efeitos à saúde humana, mas sim com a intenção de restringir os níveis de agrotóxicos em águas para consumo humano (CETESB, 2021).

A partir dos dados levantados, nota-se que os resíduos de poluentes mais preocupantes para a qualidade da água superficial são os herbicidas atrazina e metolaclor por serem as substâncias encontradas com maior frequência e em maior quantidade de amostras.

Depois do glifosato, a atrazina é o segundo agrotóxico mais utilizado no Paraná (Tabela 5). Os demais agrotóxicos encontrados nesse estudo têm uso menos expressivo no Estado quando comparado com os dois primeiros da Tabela 5. Vale a pena ressaltar que a quantificação de resíduos de agrotóxicos em água superficial depende de diversos fatores incluindo temperatura, sazonalidade, tipo de solo, pluviosidade, além, é claro, das características físico-químicas das substâncias.

Tabela 5. Quantidade em toneladas (t) comercializada em 2021 e 2022 no Paraná dos ingredientes ativos encontrados na BP3

2021		2022	
Ingrediente ativo	Quantidade em toneladas	Ingrediente ativo	Quantidade em toneladas
Glifosato	31405	Glifosato	34970
Atrazina	6394	Atrazina	5935

Relatório de Cumprimento do Objeto

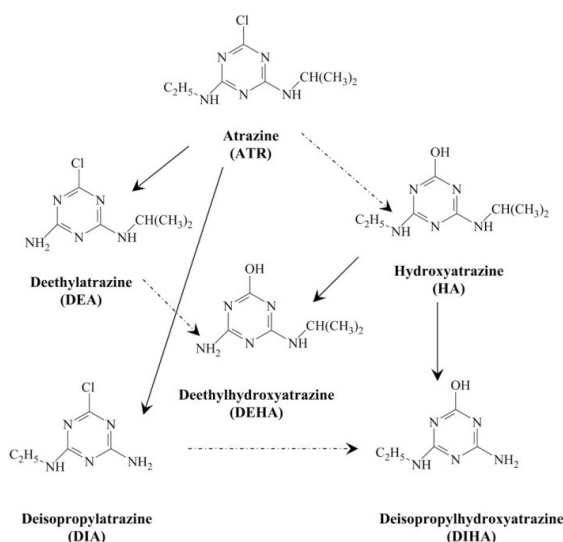
Página 36 de 92

Epoxiconazol	1427	Epoxiconazol	1235
Fluxapiroxad	1271	Fluxapiroxad	1164
Propiconazol	765	Propiconazol	814
Clopirifós	356	Metolaclor	364
Metolaclor	246	Clopirifós	279
Terbutilazina	7	Terbutilazina	125

Nota: Apesar de encontrado em uma ocorrência em BR06a, Fention não é permitido no Brasil desde 2019.
Fonte: Elaboração PTI, 2023; fonte de dados ADAPAR, 2023.

Os produtos de degradação majoritários da atrazina advêm da degradação microbiana produzindo os compostos dealquilados desetilatrizona e deisopropilatrizona (Figura 21). Por outro lado, a via de degradação química produz principalmente a hidroxiatrizona através de hidrólise. As maiores concentrações detectadas de atrazina

Figura 21. Rotas de degradação da atrazina com seus produtos majoritários



Fonte: Lin et al., 2008.

acontecem no mês de março (Brasil e Paraguai), que coincidem com o período de plantação de milho 2ª safra (Figura 14). A frequência de detecção nos pontos amostrados ao longo das coletas foi de 20% e 18% no Brasil e Paraguai, respectivamente. Seguindo a mesma tendência, estão seus metabólitos, DEA e DIA, os quais estão presentes na maior parte dos pontos coletados em março-2022. Apesar disso, DEA também foi quantificada em outros meses monitorados, sendo quantificada em 77% e 29% das amostras no Brasil e Paraguai, respectivamente. A maior concentração de atrazina, DIA e DEA no Brasil ocorreu em BR09a (497, 301 e 341 ng L⁻¹) e no Paraguai em PY07c (3188 ng L⁻¹ e 68,2 ng L⁻¹ para ATZ e DIA) e PY10b (131 ng L⁻¹ para DEA). Os valores máximos permitidos para atrazina em água superficial são 2000 e 3000 ng L⁻¹ (BR e PY, respectivamente) sendo que apenas a amostra PY07c de março-2022 foi superior ao limite. Isso pode indicar que a aplicação do herbicida havia sido realizada em período muito próximo à coleta.

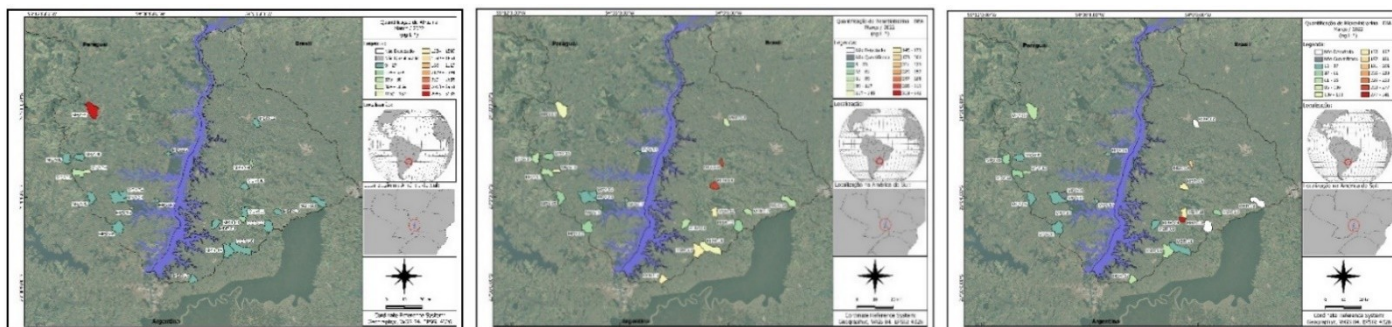
Provavelmente a presença contínua de ATZ e seu metabólitos, principalmente DEA, está relacionada ao seu amplo uso e alta frequência de aplicação, assim como à sua mobilidade e tempo de meia vida. É interessante

Relatório de Cumprimento do Objeto

observar que DEA foi detectado com mais frequência em água superficial que seu precursor, o que pode indicar a permanência de DEA por períodos mais longos. Tal fato corrobora com a necessidade de incluir metabólitos na avaliação e monitoramento da qualidade da água relacionada a presença de resíduos de agrotóxicos.

O herbicida terbutilazina foi encontrada uma única vez em PY02b em maio-2022 (82 ng L^{-1}) e seu metabólito, terbutilazina-desetil, foi encontrada apenas em BR09a e BR11a também março-2022. Esse herbicida ganhou força após o banimento da atrazina na Europa e chegou ao mercado brasileiro em 2021 (Freitas, 2021; Andognini, 2021). A identificação desses compostos pode indicar uma substituição parcial da aplicação da atrazina nas lavouras de milho e reflete o aumento do consumo expressivo entre 2021 e 2022 (Tabela 5).

Figura 22. Distribuição de resíduos de atrazina e metabólitos DEA e DIA nas 24 microbacias amostradas entre Brasil e Paraguai no mês de março-2022.

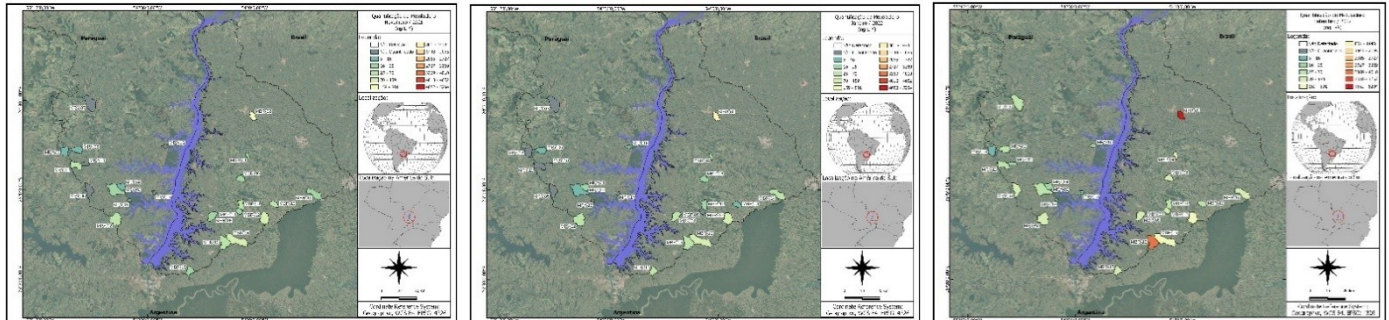


Fonte: PTI, 2020.

O metolaclor, por sua vez, é um herbicida pré-emergente de amplo espectro da classe das cloroacetamidas utilizado para controle de ervas daninhas em muitas culturas agrícolas de alimentos e rações (principalmente milho, soja e sorgo), e em gramados, plantas ornamentais, silvicultura, entre outros (USEPA, 1995). Ele foi encontrado em 88% e 43% das amostras do brasileiras e paraguaias, respectivamente, sendo o poluente que mais ocorre as águas superficiais avaliadas. No mercado brasileiro não existe produtos registados com esse princípio ativo e foi removido das monografias da ANVISA em 2019 de acordo com a Resolução - RE N° 1.967. Por outro lado, o S-metolaclor (isômero do metolaclor com maior atividade herbicida) tem permissão de uso e se mostra mais seletivo no controle de plantas daninhas (Karam et al., 2003; Zemolin et al., 2014). De acordo com o ADAPAR, 246 e 364 toneladas de ingrediente ativo de metolaclor foram utilizados em 2021 e 2022, respectivamente no Paraná. Metolaclor foi encontrado em 88% das amostras brasileiras em concentrações entre $10,97$ e $5294,24 \text{ ng L}^{-1}$. No Paraguai, a incidência de metolaclor foi bem menor (43%), com concentrações entre $5,60$ e $105,32 \text{ ng L}^{-1}$, mostrando uma aplicação bem mais abrangente no oeste do Paraná (Figura 23). De acordo com a CONAMA 357/2005 é permitido até $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (10.000 ng L^{-1}) em água superficial e nenhuma das amostras analisadas apresentou valor superior. Recentemente, a França banuiu o uso de metolaclor devido a presença de seus metabólitos acima dos limites em águas de consumo no país (ANSES, 2023).

Relatório de Cumprimento do Objeto

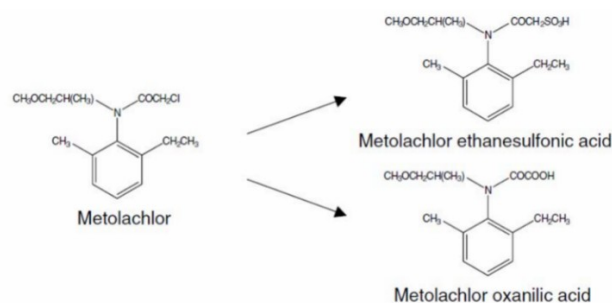
Figura 23. Distribuição de metolaclor nos locais amostrados no Brasil e Paraguai nos meses novembro de 2021, janeiro e setembro de 2022.



Fonte: PTI, 2023.

O metolaclor também sofre processos de degradação microbiana após inserido no ambiente, sendo o principal mecanismo de transformação em solo, formando ácido etanossulfônico-metolaclor (EA) e ácido oxanílico-metolaclor (OA) (Figura 24). O tempo de meia-vida do metolaclor (tempo necessário para a concentração cair à metade da inicial) é de 2,5 a 289 dias (Zemolin et al., 2014), mas não existem estudos com solos da região estudada. Ambos os metabólitos foram monitorados por LC-MS, mas os resultados ainda não estão validados. É importante reforçar que todos os dados apresentados, devido a sensibilidade do tema, são gerados a partir da metodologia desenvolvida e validada dentro de critérios analíticos rígidos. Isso evita que falsos positivos sejam registrados.

Figura 24. Metolaclor e seus principais produtos de degradação, metolaclor-EA e metolaclor-OA.



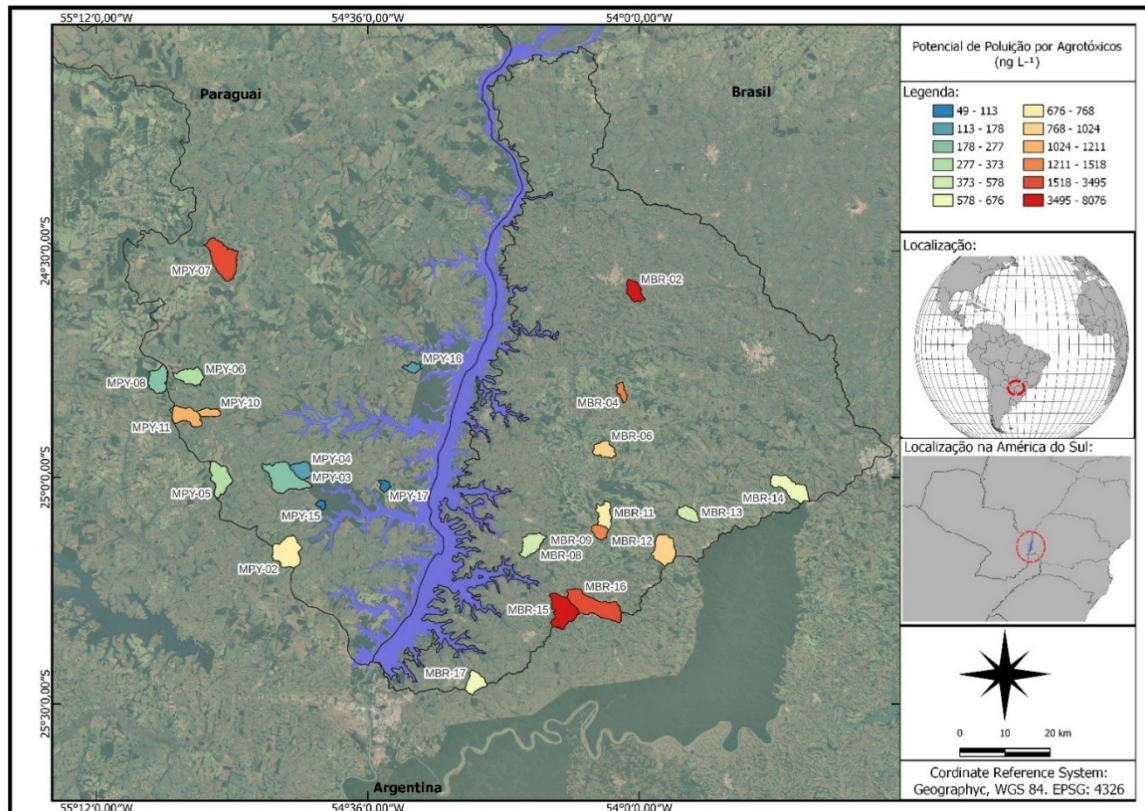
Fonte: Zemolin et al., 2014

O mapa da Figura 25 abaixo mostra o potencial poluidor nas regiões amostradas que foi calculado pelo somatório das concentrações de todos os compostos encontrados nas seis campanhas realizadas entre novembro de 2021 e setembro de 2022. Os pontos considerados mais contaminados estão com coloração mais quente no mapa. MPY07, MPY11, MBR02 e MBR16 já haviam sido considerados mais impactados no início do projeto (grupo c) pelas características de uso de solo e paisagem. O MPY10 apresentou um potencial de poluição médio-alto, também compatível com sua classificação inicial (grupo b, mediamente impactado). Na BP3, MBR09 foi inicialmente considerado com pouco impacto (grupo a). Entretanto, apesar de apresentar cobertura média de vegetação, a microbacia apresenta 68% de pastagem, o que pode ter contribuído para um maior escoamento superficial dos agrotóxicos aplicados na região. Aparentemente, a região central da bacia do Paraná 3 apresenta uma tendência de maior contaminação de água superficial. Questões como tipo de

Relatório de Cumprimento do Objeto

solo, influência da temperatura e chuvas devem ser avaliados no futuro para melhorar a compreensão da dinâmica dos agrotóxicos e metabólitos nas águas superficiais dos locais estudados.

Figura 25. Potencial poluidor calculado a partir do somatório de todas as ocorrências de agrotóxicos e metabólitos nos pontos amostrados na Bacia do Paraná 3 e no Paraguai.



Embora todos os valores de concentração obtidos para os agrotóxicos encontrados em água superficial estejam dentro dos valores regulados ou não são contemplados pelas normativas vigentes, a extensão dos efeitos crônicos quanto a exposição diária de tais micropoluentes, principalmente na biodiversidade aquática, ainda não é bem compreendida. Nesse sentido, apesar de um estudo recente no Brasil (Panis et al., 2022) apontar para alta correlação no aumento dos casos de câncer com a quantidade de compostos poluentes cadastrado na plataforma SISÁgua, deve-se ter cautela nesse tipo de abordagem pois existem diversos outros fatores correlacionáveis com a presença de câncer como alimentação, estilo de vida, pré-disposição genética, entre outros, e muitos fatores ainda não completamente compreendidos sobre os efeitos a saúde humana, além de ser necessária a utilização de resultados advindos de métodos confiáveis (Rembischevski e Paumgarten, 2022).

Na tentativa de direcionar e melhorar próximos estudos, um índice de toxicidade por agrotóxicos (PTI, do inglês *Pesticide Toxicity Index*) foi calculado a partir dos valores de concentração obtidos neste monitoramento e dados de toxicidade baseados no trabalho de Nowell et al. (2014), no qual este índice foi desenvolvido. A

Relatório de Cumprimento do Objeto

equação utilizada para o cálculo do PTI foi:

$$PTI_t = \sum_{i=1}^n (E_i/TC_{i,t})$$

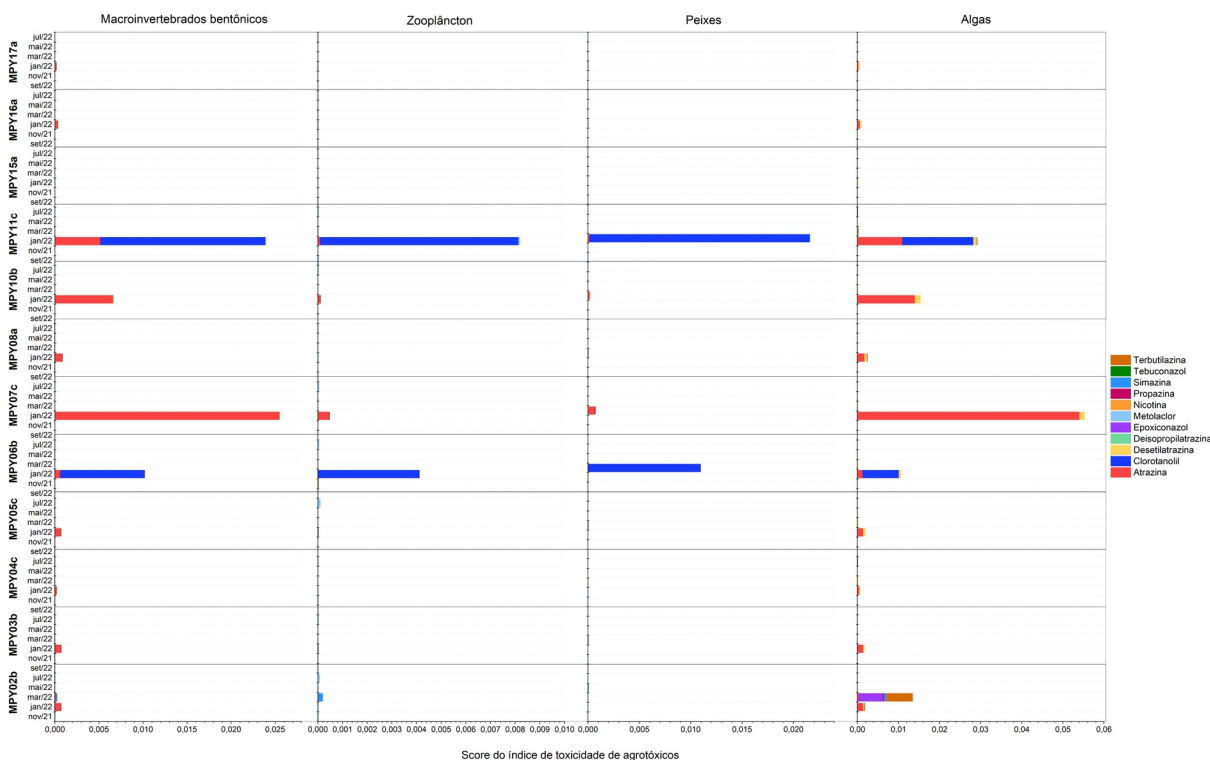
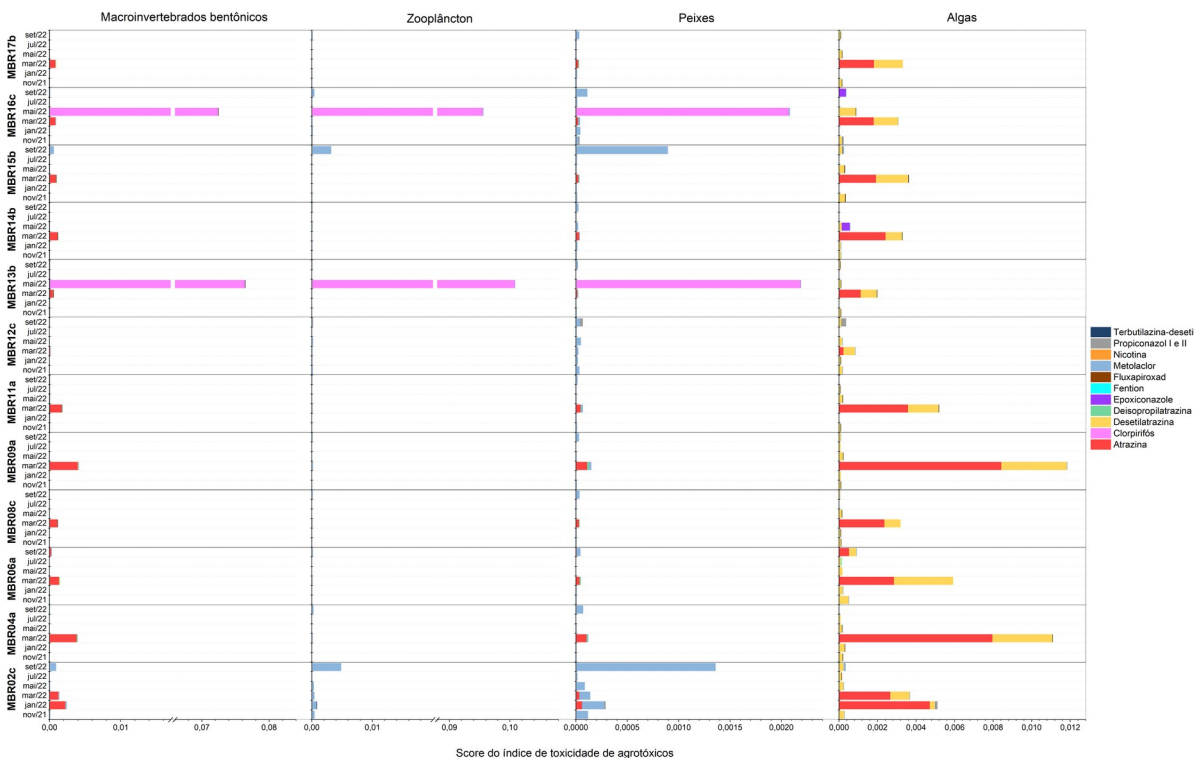
onde E_i é a concentração do pesticida i , n é o número de pesticidas em uma amostra ambiental, e $TC_{i,t}$ é a concentração de toxicidade para o pesticida i para o grupo taxonômico t . E e TC são expressas nas mesmas unidades de concentração. Como esse índice foi utilizado como um nível de triagem, valores de concentração sensível de toxicidade (STC, *sensitive toxicity concentration*) foram empregados para indicação mais sensível do potencial de toxicidade para peixe, macroinvertebrados bentônicos e zooplâncton. O índice também foi calculado para algas a partir dos valores de EC_{50} retirados da database das propriedades de pesticidas (PPBD, Lewis et al., 2016; Topaz, 2020). Infelizmente, não existem valores disponíveis para todos os compostos encontrados. Dessa forma, foram calculados os índices com as toxicidades disponíveis. O resultado obtido pode ser observado na Figura 26. Pontuações de PTI de 1 e 0,1 são usadas para estimar os limiares de toxicidade aguda e crônica previstas, respectivamente. É possível observar que, para a maioria dos pontos amostrados, a concentração dos compostos encontrados estão abaixo do limiar de toxicidade para efeito crônico. No Brasil, o que mais se aproxima de um possível efeito é o inseticida organofosforado clorpirifós para zooplâncton em MBR13b e MBR16c. É interessante apontar que esse composto foi quantificado em apenas duas ocorrências no Brasil com concentração média bastante baixa de $5,2 \text{ ng L}^{-1}$. No Paraguai, a atrazina apresentou o maior potencial de toxicidade em MPY07c, mas ainda abaixo do limiar de toxicidade crônica.

Esses dados gerados evidenciam os desafios do monitoramento ambiental e mostram a necessidade de continuar o levantamento das ocorrências de agrotóxicos e metabólitos em águas superficiais para o acompanhamento do efeito sobre as espécies aquáticas para uma melhor compreensão da dinâmica de tais micropoluentes no ambiente.

Este estudo é um dos pioneiros na ampla pesquisa de agrotóxicos em amostras de águas superficiais da região transfronteiriça Brasil-Paraguai e contribui significativamente quanto ao diagnóstico desses compostos nos recursos hídricos. O monitoramento contínuo subsidia o estabelecimento de estratégias mais eficazes para a gestão hídrica de bacias hidrográficas e priorização de ações para minimização de riscos ao meio ambiente e saúde humana. Em conclusão, evidencia-se a necessidade de ações de monitoramento permanentes e mais amplas a fim de subsidiar o planejamento e tomadores de decisões, com articulações entre diversos setores da sociedade e fortalecimento da melhoria da saúde única (humana, ambiental e animal).

Figura 26. Índice de toxicidade potencial dos agrotóxicos e metabólitos detectados em águas superficiais no Brasil e Paraguai.

Relatório de Cumprimento do Objeto



2.3.3.3 LC-MS

Assim como ocorreu para o desenvolvimento dos demais métodos de quantificação dos compostos

Relatório de Cumprimento do Objeto

multirresíduos, o desenvolvimento da metodologia ocorreu com base no estudo prévio realizado para o *screening* dos possíveis compostos que poderiam ser encontrados nas amostras e do herbicida glifosato e seu produto de degradação AMPA, além do glufosinato nas águas superficiais das bacias do entorno das margens brasileira e paraguaia que abrangem a usina de Itaipu. No início do projeto, a ideia era a criação de uma metodologia multirresíduo para atender além dos compostos triazínicos a determinação do glifosato, AMPA e glufosinato, porém nos testes preliminares não foi possível o desenvolvimento desse método único e optou-se pela separação das determinações em triazínicos e glifosato.

2.3.3.3.1 Análise das amostras para determinação de pesticidas triazínicos

Para o desenvolvimento do método quantitativo, foram selecionados os pesticidas da classe dos triazínicos: Atrazina (ATZ), Desisopropilatrazina (DIA), Desetilatrazina (DEA), Ametrina (AMT), Propazina (PPZ), Prometrina (PMT), Cianazina (CYZ), Terbutilazina (TBZ), Terbutilazina-desetil (TBZD), Hidroxiatrazina (HA), Simazina (SMZ).

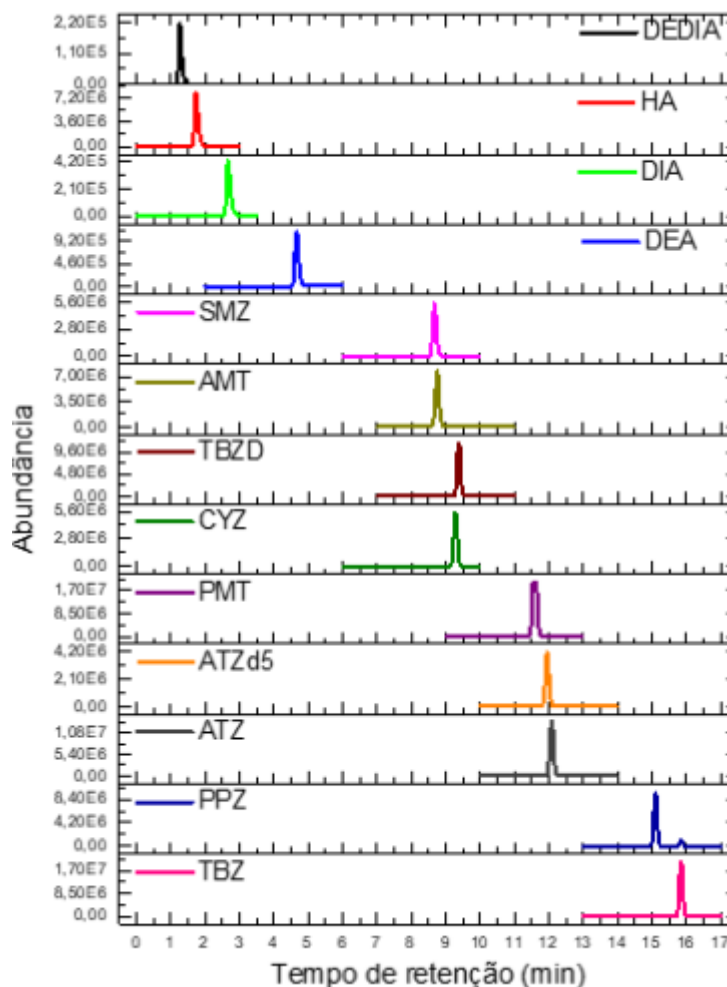
Foi realizado um levantamento bibliográfico para a realização de testes e os selecionados foram: extração líquido-líquido (LLE), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para a extração simultânea dos compostos. Após a realização dos testes, foi selecionado o melhor método para a quantificação dos compostos triazínicos, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), determinados por cromatógrafo em fase líquida com detector de espectrometria de massa (LC-MS/MS). A técnica de extração foi selecionada em função do seu alto desempenho para a determinação dessa classe de pesticidas, além do seu baixo valor de implantação e simplicidade na execução.

As condições de extração e os parâmetros cromatográficos otimizados podem ser encontrados no NITdocs. Resumidamente, o método cromatográfico: fase móvel A solução de ácido fórmico 0,1% (pH 3,0) e B acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, seguindo a eluição por gradiente: iniciando com 20% de B; chegando a 30% de B em 5 min, continuando a subir até 40% em 10 min, alcançando 50% em 13 min; mantendo por 3 min nesta condição; retornando à condição inicial (20% de B) em 18 min e, mantendo durante 2 min para estabilização da coluna, totalizando 20 min de corrida cromatográfica, com fluxo de 0,25 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e com temperatura da coluna de 40°C; processo de extração dos triazínicos: Preparo da solução com a força iônica equivalente a 10% de NaCl direto na amostra, retirado uma alíquota de 5,0 mL de amostra preparada em solução salina 10% NaCl (m/v), à qual foi adicionado 600 µL de diclorometano (DCM) (solvente extrator) e 1000 µL de acetona (solvente dispersor). A mistura foi agitada durante 30 s em vórtex e na sequência foi centrifugada a 4000 rpm (2504 RCF – relative centrifugal force) durante 5 minutos. Após a centrifugação, a fase sedimentada foi coletada com auxílio de uma microseringa, a qual foi seca no concentrador de amostras e reconstituída em 100 µL da proporção inicial da fase móvel (80:20, 0,1% ácido fórmico e ACN+0,1% ácido fórmico), filtrada com filtro de membrana PTFE 0,22 µm e analisada por LC-MS/MS.

Figura 27. Cromatogramas dos analitos analisados (200 µg L⁻¹) em cada segmento de tempo, para o íon de

Relatório de Cumprimento do Objeto

quantificação (Q1)



Fonte: PTI, 2021.

As amostras foram coletadas bimestralmente no período de novembro/21 a setembro/22 foram analisadas de acordo com o método DLLME-LC-MS/MS desenvolvido e validado para a determinação de compostos triazínicos em águas superficiais. Nesta análise foram utilizadas curvas analíticas preparadas na própria matriz da amostra, subtraindo-se o valor da área média observada nas provas em branco. Os resultados obtidos para os analitos detectados e/ou quantificados nas amostras da margem esquerda (Brasil) são apresentados na Tabela 6. De modo geral, na margem brasileira, as concentrações determinadas para a maioria dos analitos foram inferiores ao limite de detecção do método, sendo que AMT, SMZ, CYZ e TBZD, não foram detectados em nenhuma das campanhas de coleta. Em alguns casos, os analitos foram detectados, porém, estavam abaixo do limite de quantificação do método como é o caso do DIA, PMT, ATZ, PPZ e TBZ.

Na margem brasileira, especificamente na coleta de março/22, nota-se a presença de ATZ, DIA e DEA, sendo que a ATZ está presente em todos os pontos amostrais, com exceção do ponto BR12. Tal fato, está relacionado com o período de colheita da soja para a entrada da cultura de milho safrinha, momento em que a ATZ pode ser utilizada no controle pré emergente de plantas daninhas, logo após a semeadura do milho.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Nesse período foram encontradas concentrações entre 0,023 e 0,621 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ.

Tabela 6. Resultados das análises da margem esquerda (Brasil) durante as 6 campanhas de amostragem ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Analitos		BR02	BR04	BR06	BR08	BR09	BR11	BR12	BR13	BR14	BR15	BR16	BR17
DIA	nov/21	nd	0,031	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	jan/22	nd	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mar/22	nd	0,072	0,041	0,023	0,336	0,151	nd	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	0,030
DEA	mar/22	nd	nd	nd	nd	0,429	0,140	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PMT	nov/21	nd	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd
ATZ	nov/21	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	jan/22	0,149	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mar/22	0,082	0,250	0,070	0,112	0,621	0,197	nd	0,038	0,061	0,109	0,048	0,105
	mai/22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd
PPZ	nov/21	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TBZ	jan/22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
	jul/22	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Notas: nd: Não detectado; <LOQ: inferior ao limite de quantificação.

Fonte: PTI, 2023.

Para o mesmo período, nota-se que o DIA foi encontrado com frequência similar à ATZ sendo quantificado em seis dos doze pontos amostrais. Já o DEA foi encontrado em apenas dois locais de amostragem, sugerindo que a via de degradação da ATZ tem preferência para a formação de DIA. Outro fato que vale a pena destacar, é que as maiores concentrações de ATZ, DIA e DEA ocorreram no ponto de amostragem BR09, classificado como área com menor atividade agrícola e maior quantidade de mata ciliar. No entanto, durante as coletas, notou-se que em alguns terrenos acima do ponto de coleta, ocorreu uma forte erosão e esta pode ter contribuído para o aporte desses agrotóxicos no córrego. Cabe ressaltar também, que na coleta de janeiro/22 este córrego teve seu fluxo interrompido devido ao período de escassez de chuvas no estado do Paraná, sendo a coleta realizada na água que havia sido represada pelas pedras do leito do córrego. Já na coleta de março, após alguns eventos de chuva, não muito significativos, o córrego voltou a apresentar vazão.

Com relação aos resultados dos analitos detectados e/ou quantificados nas amostras da margem direita (Paraguai), apresentados na Tabela 7, observa-se que, assim como na margem esquerda, a maioria dos analitos não foi detectada pelo método, sendo que em nenhuma das campanhas amostrais foi detectada a presença de CYZ. Porém, a AMT esteve presente em todos os pontos de coleta mesmo estando abaixo do limite de quantificação. A AMT é um herbicida de controle pré e pós-emergente utilizado em diversas culturas, dentre elas no cultivo de mandioca (ANVISA, 2022), um cultivar muito produzido na região do Paraguai onde foram realizadas as campanhas amostrais, este fato justifica a presença de AMT que no Paraguai, já que há um maior uso desse pesticida do que no Brasil.

Diferentemente do Brasil, na amostragem realizada em março/22, na margem paraguaia, nota-se a presença de ATZ em 11 pontos amostrais dos 12 avaliados. No entanto, não foi observada a relação da presença dos produtos de degradação na mesma amostragem.

Tabela 7. Resultados das análises da margem direita (Paraguai) durante as 6 campanhas de amostragem ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 45 de 92

Analitos		PY02	PY03	PY04	PY05	PY06	PY07	PY08	PY10	PY11	PY15	PY16	PY17
DIA	jan/22	nd	nd	nd	1,090	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd
	mar/22	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd
	mai/22	0,119	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DEA	jan/22	nd	nd	nd	0,151	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mar/22	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd
	mai/22	0,620	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AMT	nov/21	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	<LOQ
	jan/22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,270	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ
	mar/22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd
	mai/22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	nd
	jul/22	nd	<LOQ	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
set/22	nd	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	nd	
SMZ	jan/22	nd	nd	nd	2,946	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mai/22	0,232	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TBZD	mai/22	0,031	nd	nd	nd	0,032	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PMT	jan/22	nd	nd	nd	0,173	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ATZ	jan/22	nd	nd	nd	0,360	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd
	mar/22	0,257	0,250	0,084	0,246	0,156	1,476	0,229	0,441	0,527	<LOQ	0,055	nd
	mai/22	0,080	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PPZ	jan/22	nd	nd	nd	0,071	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mai/22	<LOQ	nd	nd	Nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TBZ	mai/22	<LOQ	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Notas: nd: Não detectado; <LOQ: inferior ao limite de quantificação.

Fonte: PTI, 2023.

Além da ATZ, também foram quantificados em alguns pontos amostrais concentrações de DIA, DEA, AMT, SMZ, TBZD, PMT e PPZ. Dos pontos amostrais avaliados, o PY05 foi o que teve maior número de ocorrência da presença de agrotóxicos (ATZ, DIA, DEA, AMT, SMZ, PMT e PPZ), condizendo com a sua classificação como ponto amostral altamente impactado pela agricultura. Relatos da presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas já existem há algum tempo, conforme relatado por Sereshti e colaboradores (2022) que encontraram três agrotóxicos (bromopropilato, β -endossulfan e fenpropatrina), em água, na faixa de 0,36 e 1,10 $\mu\text{g L}^{-1}$, pertencentes a classe dos acaricidas e inseticidas.

Com relação aos agrotóxicos da classe dos herbicidas, especificamente, os herbicidas triazínicos, há relatos da presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais. Della-Flora e colaboradores (2019), ao estudarem a presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais do oeste do Paraná obtiveram concentrações máximas de 2,89, 1,22 e 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, DIA e DEA, respectivamente, para análise após os eventos de chuva. O valor detectado para ATZ foi ligeiramente superior ao valor aceitável pela legislação brasileira (2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Sem a ocorrência de eventos de chuva, os autores encontraram concentrações máximas de 0,19 e 0,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ e DEA, não sendo detectadas concentrações de DIA. Com relação aos agrotóxicos da classe dos herbicidas, especificamente, os herbicidas triazínicos, há relatos da presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais. Della-Flora e colaboradores (2019), ao estudarem a presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais do oeste do Paraná obtiveram concentrações máximas de 2,89, 1,22 e 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, DIA e DEA, respectivamente, para análise após os eventos de chuva. O valor detectado para ATZ foi ligeiramente superior ao valor aceitável pela legislação brasileira (2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Sem a ocorrência de eventos de chuva, os autores encontraram concentrações máximas de 0,19 e 0,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ e DEA, não sendo detectadas concentrações de DIA.

2.3.3.4 LC-FLD

2.3.3.4.1 Glifosato, AMPA e glufosinato

Para o glifosato, AMPA e glufosinato, testes de determinação por cromatografia iônica com o equipamento 930

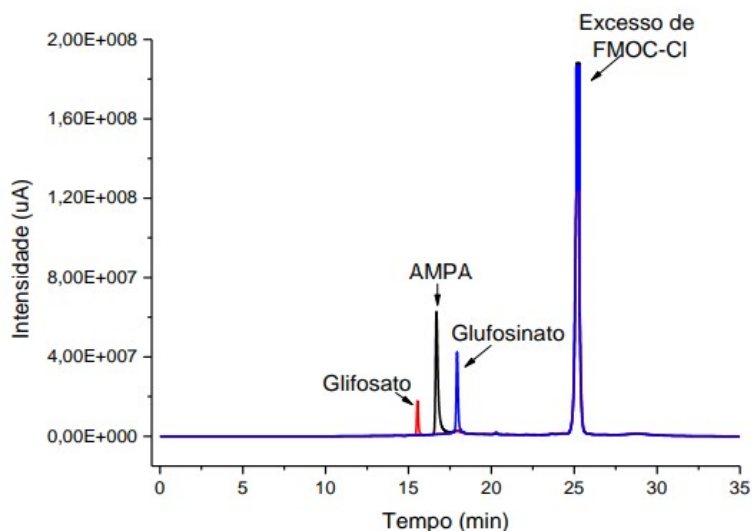
Relatório de Cumprimento do Objeto

Compact IC Flex (Metrohm®, Suíça) foram realizados, porém os dados obtidos não foram satisfatórios para a determinação e a melhor opção para a realização dos ensaios foi pela técnica de extração utilizando coluna com resina de troca iônica determinados por LC-FLD Thermo Fisher Scientific – modelo Dionex Ultimate 3000 series.

A partir disso, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida com detecção por fluorimetria (UNILA). As condições cromatográficas utilizadas para determinação de glifosato, AMPA e glufosinato o método foram: ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm – 5 µm), coluna guarda de mesma fase. Para fase móvel foi utilizada solução de ácido fosfórico 0,05% (pH 2,9) (A) e ACN (B), empregando o modo gradiente, iniciando 20% de B por 5 min; chegando a 45% de B em 15 min, onde mantém por 10 min nesta condição; entre 25 e 30 min retorna-se à condição inicial (20% de B), mantendo durante 5 min para estabilização da coluna, totalizando 35 min de corrida cromatográfica, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 20 µL e a detecção dos padrões derivatizados foi realizada nos comprimentos de onda (λ) de 317 nm (emissão) e 260 nm (excitação) e com temperatura da coluna de 30°C.

A Figura 28 representa um cromatograma sobreposto dos picos de glifosato, AMPA e glufosinato após o processo de derivatização utilizando FMOC-Cl. Sob essas condições cromatográficas, Glifosato-FMOC, AMPA-FMOC e Glufosinato-FMOC apresentaram os tempos de retenção de 15,54 min, 16,67 min e 17,93 min, respectivamente.

Figura 28. Cromatograma obtido da sobreposição dos cromatogramas dos padrões individuais de Glifosato, AMPA e Glufosinato (100 µg L⁻¹).



Fonte: PTI, 2021.

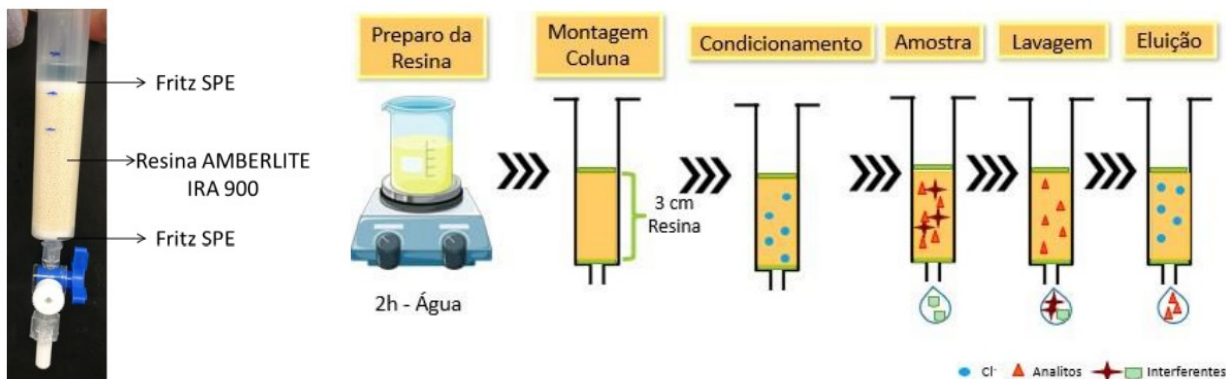
Para a extração, foram montadas colunas utilizando cartuchos de 6 mL com sistema de controle de vazão (Figura 29). Uma solução de glifosato e AMPA (250 mL, pH neutro) foi passada por este sistema, controlando o gotejamento na saída da coluna (2,5 mL min⁻¹). Posteriormente, o sistema foi lavado com 10,0 mL de água ultrapura com a finalidade de remover possíveis interferentes que possam ter ficado no sistema. Na sequência,

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 47 de 92

os analitos foram eluídos com 10,0 mL de solução de NaCl 1 mol L⁻¹ (Figura 4), sendo obtido um EF de 25 vezes. Uma alíquota de 2,0 mL do eluato foi coletada e submetida ao processo de derivatização.

Figura 29. Sistema utilizado com resina de troca iônica IRA-900 e esquema representativo do método de extração de glifosato, AMPA e glufosinato



Fonte: PTI, 2021.

Para a derivatização, 2,0 mL de amostra, foram adicionados 250 µL de tampão borato (pH 9 - 0,040 mol L⁻¹), 500 µL de ACN, e 500 µL de FMOC-Cl. A mistura foi submetida à agitação durante 30 segundos e posteriormente, permaneceu em repouso durante 30 min, em temperatura ambiente, para a completa reação. Após esse período, 3,0 mL de diclorometano foram adicionados, seguido de agitação por 10 s em vórtex, para remoção do excesso de FMOC-Cl e, em seguida, uma alíquota da fase aquosa foi coletada para análise em LC-FLD. Cabe ressaltar que na etapa de remoção do excesso de FMOC-Cl há uma pequena perda dos analitos, porém esta é uma etapa importante para evitar a saturação do detector de fluorescência.

Para análise de glifosato, AMPA e glufosinato, as amostras foram coletadas bimestralmente no período de janeiro/22 a setembro/22, sendo analisadas de acordo com o método de extração com coluna de resina de troca iônica LC-FLD desenvolvido e validado para a determinação em águas superficiais. Para a análise dos resultados foram utilizadas curvas analíticas preparadas na matriz. Na quantificação das amostras foi subtraído o valor da área média da prova em branco da matriz, a fim de não superestimar as concentrações dos analitos presentes no *pool*.

Na maioria das amostras, o método de resina de troca iônica não identificou a presença de glifosato, AMPA ou glufosinato. Na margem brasileira, o glifosato foi detectado apenas na coleta de setembro/22, no ponto BR04 e BR16. Já o AMPA foi detectado nas coletas de janeiro, julho e setembro/22, nos pontos BR02 e BR16, sendo quantificado no BR16 em janeiro (0,847 µg L⁻¹) e setembro (0,832 µg L⁻¹). Já na margem paraguaia, apenas o glifosato foi detectado nas coletas de julho/22 (PY08) e setembro/22 (PY15), no entanto, não foi possível a sua quantificação. Não houve indícios da presença de AMPA e glufosinato no Paraguai.

Na literatura há relatos da presença de glifosato, AMPA e glufosinato em águas superficiais e subterrâneas. Pires e colaboradores (2020), ao estudarem a presença de glifosato, AMPA e glufosinato em águas superficiais e subterrâneas no município de Santarém, Pará, obtiveram concentrações de glifosato na faixa de 1,5 a 9,7 µg L⁻¹ e de 0,65 a 1,93 µg L⁻¹ para AMPA.

Uma maior frequência de detecção dos analitos nas últimas coletas, pode estar relacionada com o tempo de

Relatório de Cumprimento do Objeto

armazenamento. As amostras de setembro/22 foram analisadas imediatamente, enquanto as amostras de julho/22 foram congeladas apenas por 2 meses. Já as demais foram congeladas por um período superior, chegando a 9 meses a -20°C , até a análise. Fato este, que pode ter levado à degradação dos analitos durante o período de armazenamento, mesmo havendo relatos na literatura de que o glifosato é estável em amostras congeladas por até 18 meses (PIRES et al., 2020; USEPA, 1990). Outra possibilidade que pode ter ocorrido, com relação à não detecção dos analitos na maioria das amostras, pode estar relacionada ao fato de que estes podem estar em outro compartimento ambiental (solo e sedimento), como foi o caso de Castro Berman e colaboradores que notaram uma maior incidência dos analitos no sedimento. Ou ainda, os analitos estão presentes na matriz, porém em valores inferiores ao LOD do método. Desta forma, são necessários estudos complementares avaliando a presença de glifosato, AMPA e glufosinato em solo e sedimento, juntamente com amostras de águas naturais.

Desta forma, sugere-se que, para a determinação de glifosato, AMPA e glifosato em águas naturais, seja realizada conjuntamente a avaliação da presença desses analitos em solo ou sedimento.

Meta 3

3.1 Seleção dos Riachos

Considerando uma análise conjunta entre dados de qualidade da água e biodiversidade os rios a serem amostrados foram selecionados em conjunto entre as metas 2 e 3. Portanto as informações apresentadas no item 2.1 representam a completude deste item.

3.2 Coleta de Amostras

3.2.1 Variáveis Ambientais

Em cada riacho foi determinado um segmento de 50 metros de comprimento e neste segmento foram coletadas amostras de água para análise em laboratório e determinação de variáveis físicas e químicas. Cada segmento foi caracterizado e foram medidas as seguintes variáveis morfométricas: (i) largura média, utilizando fita métrica; (ii) velocidade média da correnteza, medida com correntômetro e, (iii) vazão, estimada a partir dos dois parâmetros anteriores. Outros parâmetros também foram medidos *in situ* utilizando-se uma sonda multiparâmetro Horiba U-51 e incluíram: temperatura da água, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido. No ponto médio do segmento selecionado, foi coletada amostra de água com um frasco âmbar de um litro para análise de nutrientes.

3.2.2 Levantamento de Macroalgas

A amostragem de algas nos riachos selecionados seguiu a técnica de transeção, selecionando um trecho de entre 15 e 30 metros, onde o material foi coletado a partir da observação visual do leito com ajuda de um balde com fundo de acrílico para auxiliar na melhor visualização. Quando identificado a presença de macroalgas, as rochas eram separadas e raspadas para a remoção e coleta. O material biológico coletado foi acondicionado em frascos e fixado com formaldeído 4%.

Relatório de Cumprimento do Objeto

3.2.3 Levantamento de Diatomáceas

Para a amostragem de diatomáceas foram selecionadas aleatoriamente entre 5 e 10 pedras arredondadas, buscando compor a heterogeneidade de cada um dos segmentos de riacho. As diatomáceas foram raspadas das pedras com escovas de dente e fixadas em frascos plásticos em solução de lugol 4%.

3.2.4 Levantamento de Macroinvertebrados

A amostragem de macroinvertebrados bentônicos utilizou a metodologia de *kick sampling*, que consiste na varredura dos diferentes micro-habitat do riacho, visando maior representatividade da fauna aquática. Os organismos foram capturados utilizando-se de um coletor do tipo *handnet* com malha de 500 micrometros. Posteriormente a coleta, o material biológico foi acondicionado em sacos plásticos e conservados em álcool 70%.

3.2.5 Levantamento de Peixes

A metodologia utilizada para coleta de dados foi baseada nos protocolos e trabalhos elaborados por Kaufmann et al (1999) e Hooper & Hubbart (2016), com modificações, que indicam os parâmetros e metodologias para coletas de dados em rios e outros ambientes aquáticos. Em cada riacho selecionado, os dados dos peixes foram coletados em um trecho de 30 metros. Em cada riacho selecionado, os dados dos peixes foram coletados em um trecho de 30 metros. Os dados ambientais, como as características físicas do riacho e as características físico-químicas da água, foram coletados por meio da divisão do trecho de 30 metros em 15 segmentos de dois metros.

As coletas de peixes foram realizadas em três períodos do ano de 2019, para tentar representar, na medida do possível, a assembleia presente na região, esses períodos foram em fevereiro (período chuvoso/Safra), julho (período seco/entre safra/vazio sanitário) e novembro (período chuvoso/safrinha). Para a coleta, foram utilizadas duas redes ativas e uma mochila de pesca elétrica, dando descargas na água, com uma variação de 400 a 600 volts, dependendo da condutividade da água. A pesca foi padronizada, no sentido oposto à corrente do riacho, ou seja, começando a jusante e terminando a montante.

Das espécies coletados no campo, pelo menos um indivíduo representativo de cada morfotipo foi armazenado em formaldeído a 10%, para posterior identificação taxonômica, e os demais indivíduos foram armazenados em etanol absoluto, para posterior obtenção e análise dos dados moleculares. Para as espécies *Ancistrus sp.* e *Heptapterus mustelinus*, foram coletados entre 5 e 10 indivíduos e transportados vivos até os Laboratórios da UNILA para os procedimentos das técnicas de mutagênese e histologia, aos quais exigem preparo e coleta de sangue e tecidos de indivíduos vivos.

3.3 Triagem e identificação das amostras

3.3.1 Macroalgas

A triagem e identificação das espécies de macroalgas coletadas em campo foi realizada em laboratório utilizando microscópio óptico Zeiss modelo AxioScope A.1 equipado com sistema de captura de imagem,

Relatório de Cumprimento do Objeto

através da segregação e observação do material coletado.

Considerando as coletas realizadas e amostras processadas, foram identificadas 64 espécies de macroalgas, sendo os filos mais representativos: Cyanobacteria e Chlorophyta. Destaca-se a maior ocorrência das espécies *Potamolinea aeruginosa* no Paraguai e *Arnoldiella emedii* no Brasil.

3.3.2 Diatomáceas

O exame taxonômico das diatomáceas foi baseado em análise populacional com o objetivo de representar a variabilidade morfológica dos táxons. No laboratório o material orgânico das amostras foi removido seguindo o método de Battarbee et al. (2001), utilizando peróxido de hidrogênio 35% e ácido clorídrico 37%. Após a remoção do material orgânico foram preparadas lâminas permanentes utilizando Naphrax como meio de inclusão (IR = 1,73) e volumes de amostras variando 0,05 a 7 mL de amostra oxidada, de modo a alcançar entre 30 e 40 valvas de diatomáceas observadas em um aumento de 400x ao microscópio óptico. O sistema de classificação utilizado foi o de Medlin & Kaczmarek (2004) para as categorias supra-ordinais e Round et al. (1990) para as subordinais.

Para a análise quantitativa das diatomáceas foi realizada contagem em transeções longitudinais nas lâminas permanentes de acordo com o método de Battarbee et al. (2001) tendo como unidade básica de contagem a valva (frústula completa foi considerada como duas valvas) sempre no aumento de 1000x ao microscópio óptico. Os critérios adotados para o limite de contagem era: mínimo de 400 valvas no total e eficiência mínima de contagem de 90% (Pappas & Stoermer, 1996).

Considerando as amostras coletadas e processadas para Brasil e Paraguai, foram registrados 296 táxons de diatomáceas, exemplos podem ser verificados na Figura 30.

3.3.4 Macroinvertebrados

O processamento das amostras ocorreu no laboratório de análises ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus Toledo-PR. A primeira etapa consistiu na limpeza de substrato maiores (folhas, galhos, pedregulhos), seguida da limpeza de sedimentos finos e a segregação do material biótico e abiótico. Ainda em laboratório o material segregado foi lavado e peneirado sob água corrente em peneiras de 200 a 500 micrometros, após a lavagem as amostras foram identificadas e fixadas em álcool 70%. Após o processamento as amostras foram pré-triadas através da imersão da amostra em solução salina, provocando a flutuação de indivíduos menos densos que foram coletados com uso de peneiras e também fixadas em álcool 70%. O material resultante foi novamente separado utilizando estereomicroscópio (lupa) através da observação de transectos (Figura 31). Após as devidas separações os organismos foram identificados a nível taxonômicos de família.

Quando considerada a triagem das amostras foram identificadas 4.419 organismos em distintas fases de desenvolvimento e diversas famílias. Para família Elmidae foram identificados 1.466 organismos, sendo 909 em estágio larval e 557 adultos. Da família Chironomidae foram identificados 677 organismos, para família Hydropsychidae 506 organismos, da família Perlidae 143 organismos e 136 organismos da família Staphilinidae.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Figura 30. 1-2. *Achnanthes paraexigua*. 3-5. *Achnantheidium exiguum* var. *constrictum*. 6-10. *Achnantheidium jackii*. 11-13. *Achnantheidium lineare*. 14-18. *Achnantheidium minutissimum*. 19-21. *Achnantheidium peetersianum*. 22-24. *Achnantheidium tropicocatenatum*. 25-27. *Adlafia drouetiana*. 28-29. *Aulacoseira granulata* var. *angustissima*. 30-33. *Aulacoseira pusilla*. 34-37. *Aulacoseira brasiliensis*. 38-39. *Brachysira brebissonii*. 40-42. *Brachysira neoexilis*. 43. *Cocconeis acuta*. 44-47. *Cocconeis fluviatilis*. 48-51. *Cocconeis lineata*. Escala=10 μm .

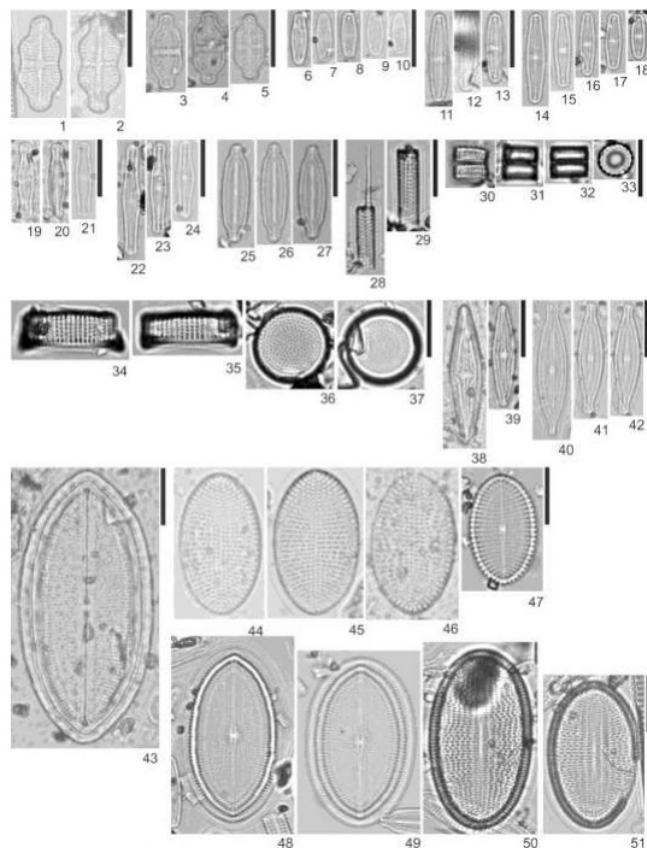
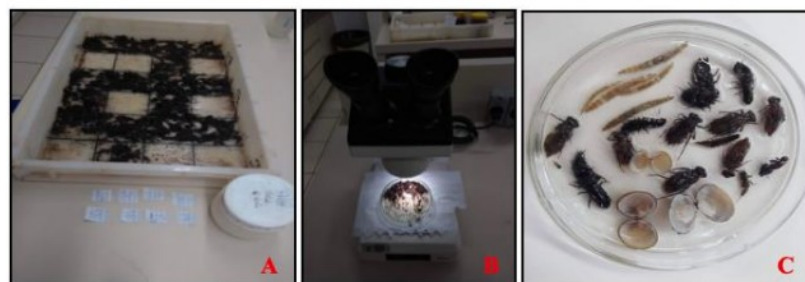


Figura 31. A: aplicação da metodologia de subamostragem (triagem por quadrats) B: triagem da amostra em microscópio estereoscópio C: Identificação de macroinvertebrados.



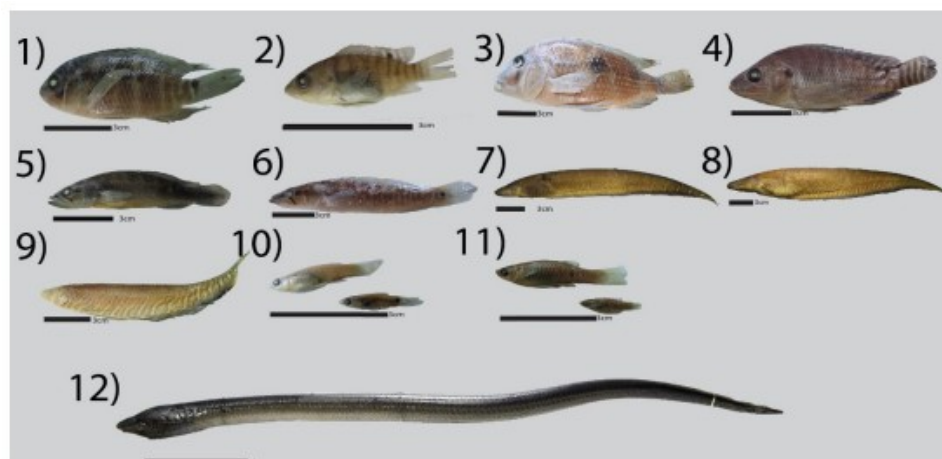
Relatório de Cumprimento do Objeto

3.3.5 Peixes

Dos indivíduos coletados foram identificadas um total de 53 espécies, 39 no Brasil e 44 no Paraguai, representando 6 diferentes ordens. Das espécies identificadas para o Brasil, 9 foram exclusivas. No Paraguai, das espécies identificadas 14 delas foram exclusivas, exemplos podem ser vistos na Figura 32.

Como citado anteriormente indivíduos das espécies *Ancistrus sp.* e *Heptapterus mustelinus* foram identificados em campo e separados para triagem em vivo em laboratório.

Figura 32. Espécimes representativos das espécies de Cichliformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes coletadas: 1) *Cichlasoma paranaense*; 2) *Coptodon rendalli*; 3) *Geophagus brasiliensis*; 4) *Oreochromis niloticus*; 5) *Crenicichla britskii*; 6) *Crenicichla jaguarensis*; 7) *Gymnotus cf. pantanal*; 8) *Gymnotus inaequilabiatus*; 9) *Gymnotus sylvius*; 10) *Poecilia reticulata*; 11) *Phaloceros harpagos*; 12) *Synbranchus mamoratus*.



O procedimento para o processamento dos organismos vivos pode ser conferido na Figura 33, abaixo. A partir do processamento dos peixes vivos foram geradas amostras de tecidos, órgãos e sangue para a realização de Histologia Molecular e Mutagênese, através do estudo e avaliação de tecidos e células destes organismos.

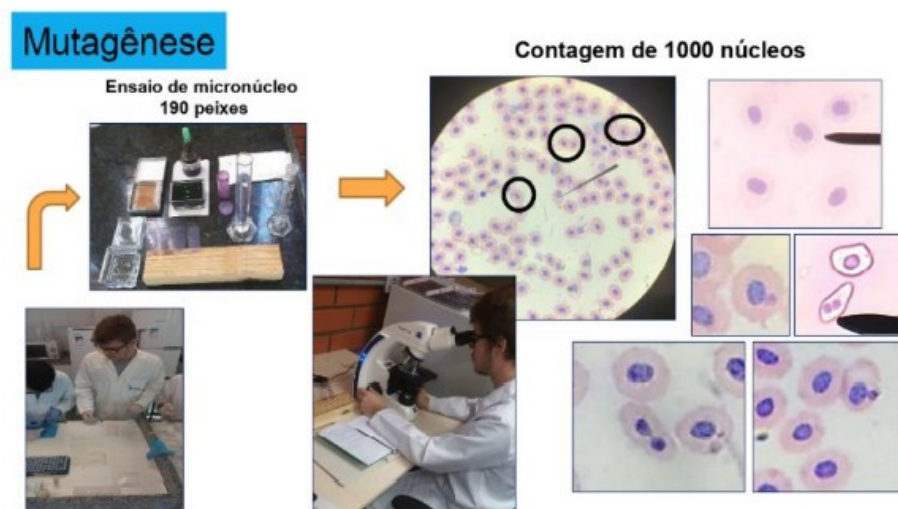
Figura 33. Processamento e análise das amostras de peixe vivo

Relatório de Cumprimento do Objeto



A Mutagênese nas amostras de peixes foi avaliada utilizando amostras de sangue dos peixes com uso de técnicas de micronúcleo *pisceo*, Figura 34, onde busca-se alterações morfológicas em núcleos de eritrócitos. Nas amostras de indivíduos coletados no Paraguai as alterações nucleares nos eritrócitos foram mais frequentes na espécie *Heptapterus mustelinus* do que na espécie *Ancistrus sp.* Nas quais as alterações mais comuns foram *Notched*, *Blebbed* e *Lobbed*. Alterações tipo *Notched* são caracterizadas pela presença de um corte bem definido na forma do núcleo, onde não há material nuclear e é delimitado pela membrana celular. Alterações do tipo *Blebbed* constituí uma pequena evaginação da membrana nuclear ligada ao núcleo, podendo conter eucromatina ou heterocromatina. *Lobbed* são alterações do tipo evaginação mais proeminentes do que as do tipo *Blebbed*. Alterações que podem causar clastogenicidade, que é a destruição do material genético, sendo elas Micronúcleos, Pontes Anafásicas e Células Binúcleadas não foram frequentes as espécies coletadas nos períodos de amostragem, tanto para o Brasil, quanto para o Paraguai.

Figura 34. Ensaio de mutagênese

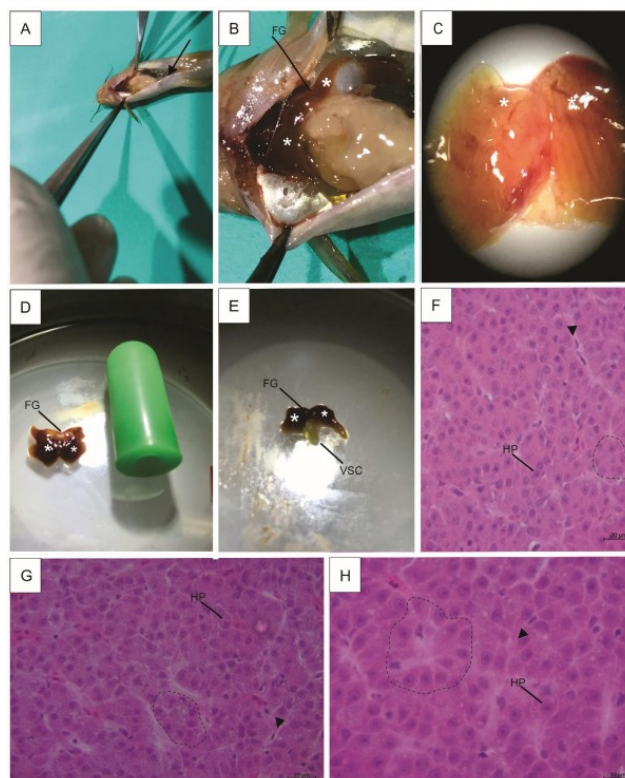


Relatório de Cumprimento do Objeto

Os estudos de histologia se deram pelo preparo de lâminas histológicas a partir do material fixo, desidratado e cortado em micrótomo com sua fixação em bálsamo do Canadá. Para cada amostra estabeleceu a análise de uma lâmina, selecionada casualmente com 5 cortes. Para cada corte foi escolhida também de forma casual uma área de 0,01mm². A metodologia aplicada nesta etapa baseou-se em Bernet et al. (1999), que se baseia na extensão e relevância patológica das alterações observadas. Foram observadas 110 lâminas de tecido de fígado da espécie *Heptapterus mustelinus*, coletados nos pontos de amostras do Brasil e Paraguai conforme Figura 35.

No ponto de vista das análises moleculares, aplicou-se a técnica de genômica de populações selecionando as populações de *Ancistrus sp.* e *Heptapterus mustelinus* devido a sua larga abundância e distribuição, e por ocuparem nichos ecológicos distintos. Ao longo das coletas 376 exemplares foram submetidos as técnicas de biologia molecular para extração, purificação e qualificação de padrões para serem enviadas a Nova Zelândia para análises. Após o envio das amostras constatou-se que ao chegar ao laboratório de destino à qualidade e condições não atenderam aos mínimos requeridos para a análise.

Figura 35. Morfologia e histologia do fígado de *H. mustelinus* corado com Hematoxilina e Eosina (HE). A: incisão. B, C, D: visão geral do fígado (FG); E: fígado conectado a vesícula biliar (VSC). F, G, H: tecido hepático normal, mostrando hepatócito (HP), sinusóide (ponta da seta), cordões (contorno pontilhado). F, G: 500 x; H: 1000 x; C (estereomicroscópio) 300 x.



3.4 Análises estatísticas

Para unir os esforços obtidos nos resultados foi necessário utilizar análises multivariadas integradoras capazes de fornecer predições robustas a respeito dos principais preditores das mudanças em parâmetros relacionados

Relatório de Cumprimento do Objeto

à estrutura e diversidade de comunidades de algas e peixes de riachos da região transfronteiriça entre Paraguai e Brasil. Assim, tendo em vista que a principal análise utilizada tem o potencial de elucidar tanto a influência direta quanto a indireta dos micropoluentes e demais variáveis na estrutura das comunidades, as hipóteses foram:

- Hipótese 1: Haverá influência direta dos micropoluentes nos níveis tróficos mais basais, como as algas, revelando contato entre os contaminantes e tais organismos. Enquanto os peixes, refletirão tanto a influência direta dos micropoluentes presentes na água quanto indireta via consumo de níveis tróficos contaminados;
- Hipótese 2: Esperamos encontrar uma menor riqueza de espécies em riachos localizados em áreas mais impactadas pela agricultura e que potencialmente apresentarão maior quantidade de micropoluentes;
- Hipótese 3: Os parâmetros de qualidade da água apresentarão efeito direto em todos os táxons analisados, enquanto a estrutura física do riacho (heterogeneidade) influenciará a riqueza e abundância das espécies de maneira direta.

Para melhoria dos resultados, foram realizadas análises exploratórias para visualizar as características e distribuição dos dados amostrados, encontrar possíveis outliers e testar a presença de multicolinearidade entre as variáveis. Dentre as análises que foram utilizadas estão:

- Testes de normalidade e homocedasticidade;
- Fator de inflação de Variância (VIF);
- Box-plot;
- Análise de correlação.

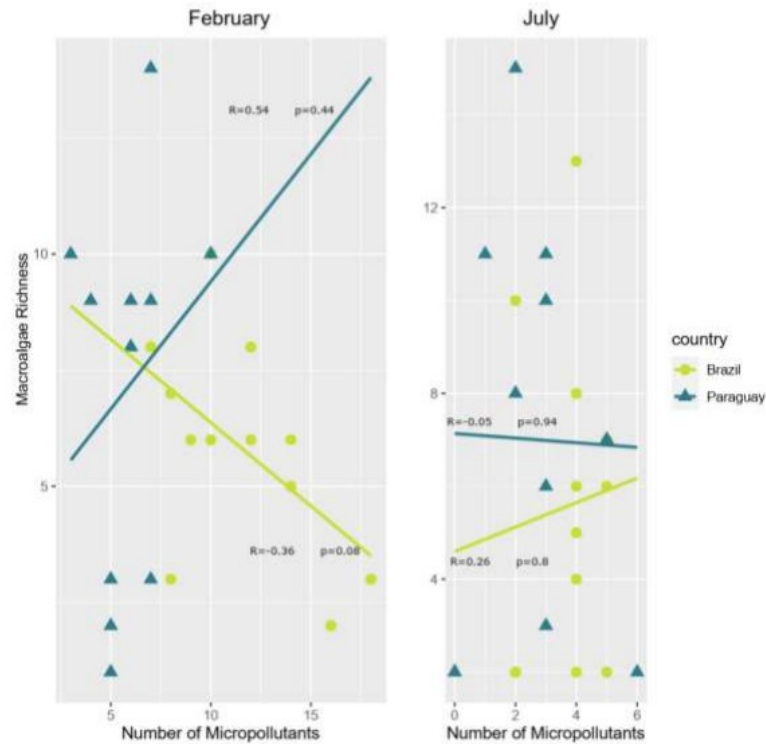
Para testar o efeito de variáveis da paisagem, micropoluentes e estrutura dos riachos sobre a biodiversidade de algas e peixes utilizou-se da análise Modelagem de Equações Estruturais (Structural Equation Modeling - SEM, Shipley, 2002; Lefcheck, 2016), análise que tem sido bastante utilizada para explorar sistemas ecológicos complexos (e.g., García-Palacios et al., 2016).

3.4.1 Comparação do efeito do número de micropoluentes totais e de herbicidas na riqueza de espécies

Em relação à riqueza de macroalgas e o total de micropoluentes encontrados tanto no Brasil quanto no Paraguai, não houve relação causal entre essas duas variáveis nem para o mês de fevereiro nem para o mês de julho (Figura 36).

Figura 36. Gráfico ilustrando o resultado da análise de regressão linear entre o número total de micropoluentes e a riqueza de macroalgas em cada um dos países para os meses de fevereiro e julho. R = coeficiente de regressão; $p < 0.05$ = resultados significativos.

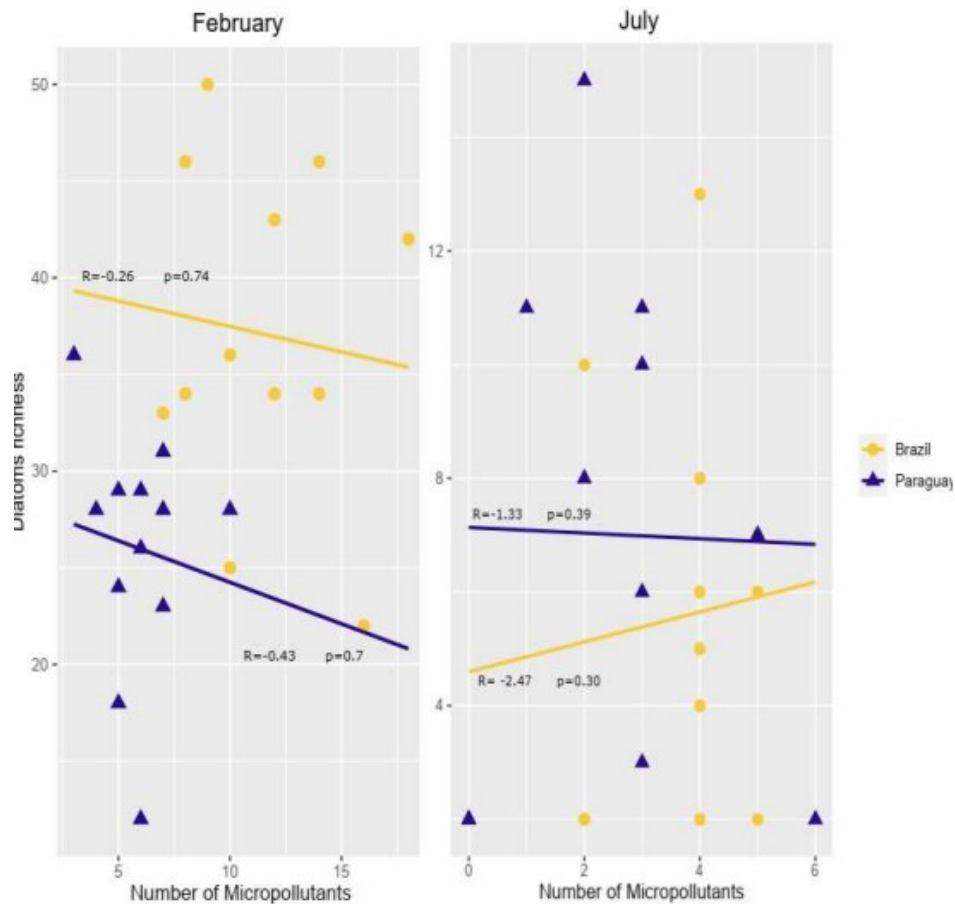
Relatório de Cumprimento do Objeto



Em relação à riqueza de diatomáceas e o total de micropoluentes encontrados tanto no Brasil quanto no Paraguai, não houve relação causal entre essas duas variáveis, mesmo para o mês de fevereiro nem para o mês de julho (Figura 37).

Figura 37. Gráfico ilustrando o resultado da análise de regressão linear entre o número total de micropoluentes e a riqueza de diatomáceas em cada um dos países para os meses de fevereiro e julho. R = coeficiente de regressão; $p < 0.05$ = resultados significativos.

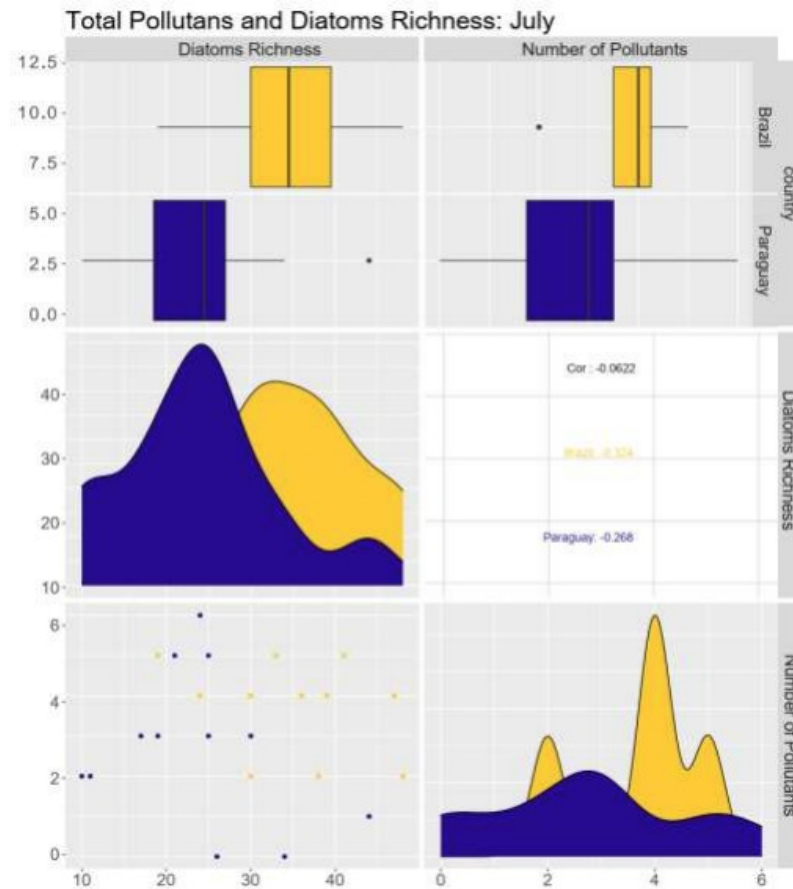
Relatório de Cumprimento do Objeto



Através do gráfico de distribuição dos dados para o mês de julho (Figura 38), verificou-se que existe uma maior variação e acúmulo (ilustrada pelos picos na distribuição) na riqueza de diatomáceas em riachos paraguaios, já em riachos brasileiros houve maior concentração de micropoluentes os quais apresentaram maior variação no Paraguai.

Figura 38. Quadro comparativo da riqueza de diatomáceas versus o número total de micropoluentes entre os riachos do Brasil (amarelo) e do Paraguai (azul) no mês de julho.

Relatório de Cumprimento do Objeto



Em relação à riqueza de diatomáceas e ao total de herbicidas também não foi encontrada relação causal entre essas duas variáveis, tanto para o mês de fevereiro quanto para o mês de julho seja para o Brasil ou para o Paraguai (Figura 39). Ao observarmos o gráfico de distribuição dos dados (Figura 40), verificamos que existe uma maior variação e acúmulo na riqueza de diatomáceas em riachos no Paraguai, em relação ao número de herbicidas houve maior variação entre os riachos brasileiros, e maior acúmulo em alguns riachos paraguaios. O gráfico de distribuição de pontos ilustra a distribuição do número de herbicidas versus a riqueza de diatomáceas dos pontos amostrais de ambos os países (Figura 40).

Figura 39. Gráfico ilustrando o resultado da análise de regressão linear entre o número total de herbicidas e a riqueza de diatomáceas em cada um dos países para os meses de fevereiro e julho. R = coeficiente de

Relatório de Cumprimento do Objeto

regressão; $p < 0.05$ = resultados significativos.

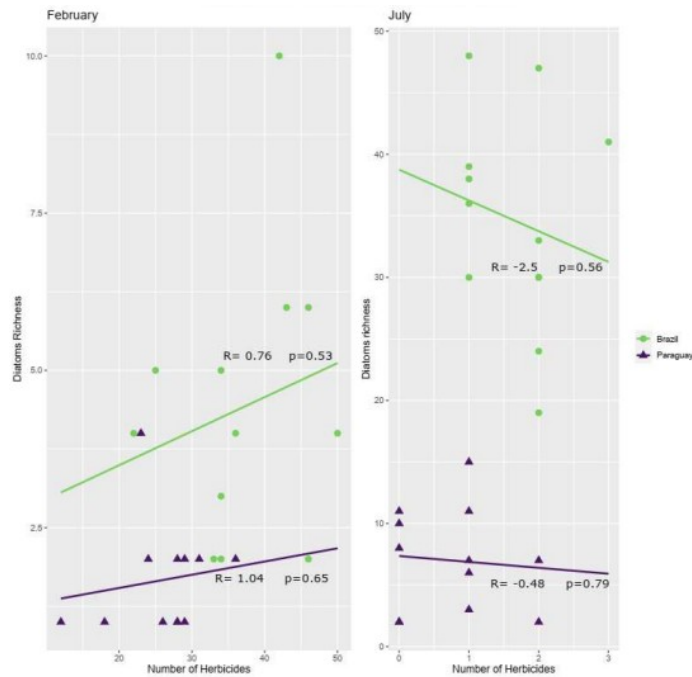
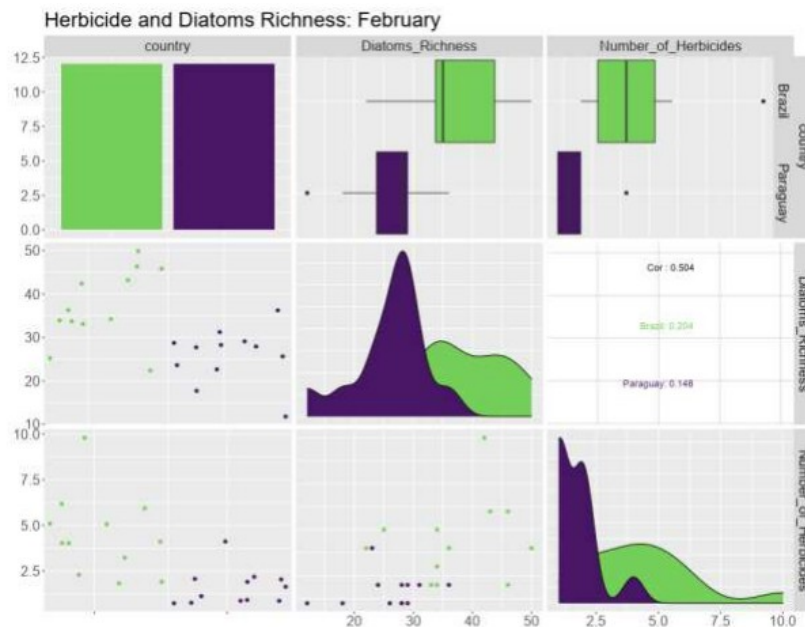


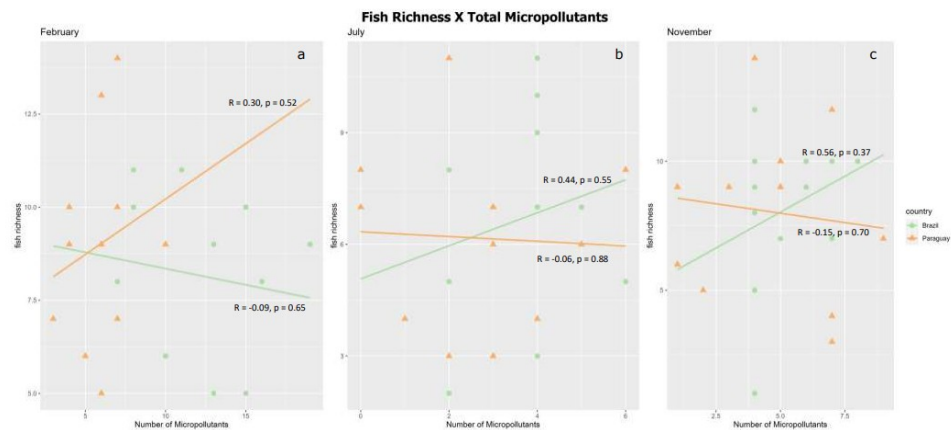
Figura 40. Quadro comparativo da riqueza de diatomáceas versus o número total de herbicidas entre os riachos do Brasil (verde) e do Paraguai (roxo) no mês de fevereiro.



Sobre a relação da riqueza de peixes e o total de micropoluentes encontrados no Brasil e no Paraguai, não houve relação causal entre essas duas variáveis para nenhum dos três meses analisados (fevereiro, julho e novembro, Figuras 41 a, b, c respectivamente). Dessa forma, não foi possível inferir que os micropoluentes estão influenciando a riqueza de peixes nos países analisados.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Figura 41. Gráficos ilustrando o resultado da análise de regressão linear entre o número total de micropoluentes e a riqueza de peixes em cada um dos países para os meses de fevereiro, julho e novembro. R = coeficiente de regressão; $p < 0.05$ = resultados significativos.



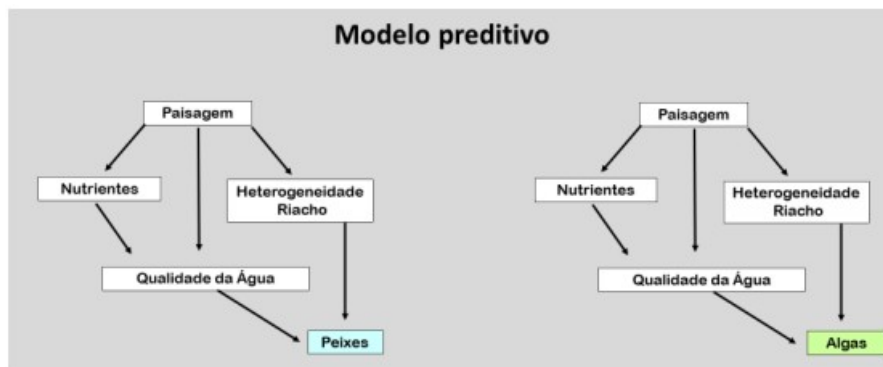
Os resultados apresentados acima devem ser interpretados com cautela, uma vez que os dados dos micropoluentes não representam quantificações, mas apenas a presença ou não de determinado micropolvente no riacho amostrado. Saber quais micropoluentes estão ou não presentes, possibilita inferir o grau de contaminação relativo ao número total de compostos encontrados tanto dos riachos quanto das áreas em seu entorno, incluindo o lado de Itaipu. Além dos micropoluentes afetarem diretamente organismos autótrofos, seus efeitos negativos também são verificados nas comunidades de peixes, anfíbios (girinos) e macroinvertebrados. A revisão de Brock et al. (2000), demonstrou que concentrações de herbicidas acima de 0.1 na escala de unidades tóxicas capazes de afetar pelo menos 50% dos indivíduos (TU_gsa) apresentam um efeito tóxico de longo prazo, o que impacta tanto a diversidade das comunidades de algas, quanto macroinvertebrados, peixes e girinos de maneira prolongada no tempo.

3.4.2 Análises Estruturais Integradoras

Como o número de variáveis preditoras é maior do que o de unidades amostrais, o que prejudica substancialmente o poder preditivo e performance da pSEM, optamos por rodar uma Análise de Componentes Principais (PCA) para resumir as variáveis dos grupos de nutrientes, variáveis físico-químicas - qualidade da água -, e usar os eixos da PCA como variável explanatória juntamente com o índice de heterogeneidade calculado com base nas variáveis de *riverscape*. Além de considerar os países como variável preditora e verificar se o fato de os riachos estarem localizados em países diferentes diferiria em termos de riqueza de espécies, também realizamos os testes da análise pSEM com cada país em separado para que pudéssemos comparar os efeitos das variáveis na biodiversidade dos riachos brasileiros e paraguaios de acordo com os parâmetros inicialmente estabelecidos. Nosso modelo geral obedeceu a rota preditiva da Figura 42.

Figura 42. Modelo preditivo global base para a construção dos modelos de equações estruturais.

Relatório de Cumprimento do Objeto



A partir da rota preditiva, nós criamos modelos (globais e parciais) utilizando modelos lineares mistos (nlme – Pinheiro et al. 2020) e considerando o espaço como variável aleatória. Avaliamos três modelos diferentes para cada país e grupo taxonômico. Para determinar o modelo mais adequado, utilizamos o Critério de Akaike corrigido para amostras pequenas (AICc), implementado no pacote piecewiseSEM (Lefcheck 2016; RCore Team 2019). Esta etapa faz com que selecionemos modelos mais simples e robustos para testar os efeitos diretos e indiretos das mudanças na paisagem, em parâmetros da qualidade da água (variáveis físico-químicas), heterogeneidade (riverscape) e disponibilidade de nutrientes e seus resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Seleção de Modelos corrigida pelo critério de Akaike (AICc) performada para reduzir o número de variáveis relacionadas à paisagem, micropoluentes, heterogeneidade e comparações entre Brasil e Paraguai nos modelos piecewiseSEM. Para avaliar o ajuste do modelo, utilizamos a estatística C de Fisher e o valor associado de P para cada modelo ($p > 0.05$ indica que o modelo é adequado para o teste de hipótese).

Seleção de Modelos	Variáveis removidas do modelo <i>full</i>	AICc	Δ AICc	C de Fisher	P
<i>Fish abundance</i>					
Full model	-	61.71	45.89	6.51	0.368
1	UP	52.66	36.84	6.66	0.574
2	UP+FP	46.90	31.08	8.57	0.574
3	UP+FP+Het	19.33	3.51	5.80	0.446
Final	UP+FP+Het +AP	15.82	0	5.60	0.692
<i>Fish richness</i>					
Full model	-	61.71	44.13	6.51	0.368
1	UP	54.25	36.67	8.25	0.409
2	UP +AP	49.18	31.60	10.85	0.369
Final	UP+AP+Cty	17.58	0	4.05	0.669
<i>Macroalgae richness</i>					

Relatório de Cumprimento do Objeto

Full model	-	61.71	44.08	6.51	0.368
1	AP	52.65	35.02	6.65	0.575
2	AP+Het	18.21	0.58	0.96	0.915
Final	AP+Het +Cty	17.63	0	4.1	0.663
<i>Diatom richness</i>					
Full model	-	61.71	44.49	6.51	0.368
1	FP	52.53	35.31	6.53	0.588
2	FP+AP	45.91	28.69	7.58	0.669
Final	FP+AP+Het	17.22	0	3.69	0.718

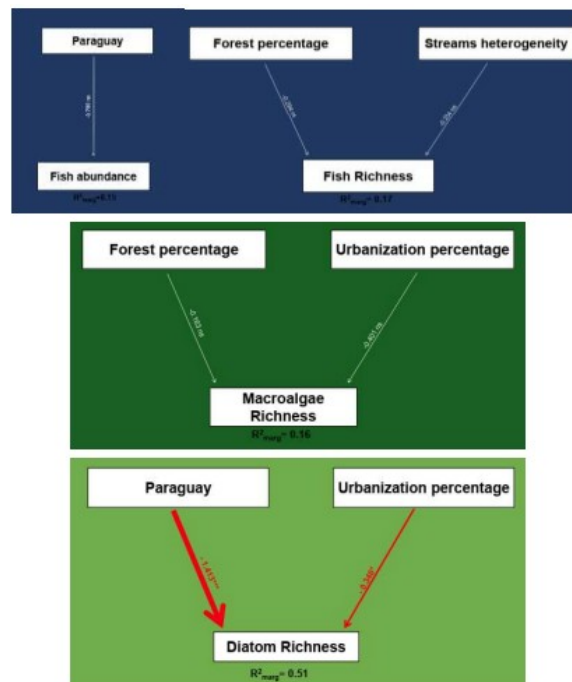
FP=Forest percentage, UP=Urbanization percentage, AP= Agriculture percentage, Het=Streams heterogeneity and Cty=Country. *Full model*: $Y = FP + UP + AP + Het + Cty$, which Y = fish abundance or fish richness or macroalgae richness or diatom richness.

Quando consideramos os países como possíveis variáveis explanatórias para nosso sistema, com exceção para um efeito negativo do Paraguai e da porcentagem de área urbana na riqueza de diatomáceas, não tivemos mais efeitos significativos em nenhum outro grupo biológico (Figura 43). Dessa forma, tanto o fato de o riacho estar localizado no Paraguai quanto uma maior porcentagem de urbanização reduzem a riqueza de diatomáceas em riachos localizados na BP3. Este resultado evidencia que, independentemente do país, peixes e macroalgas estão sendo afetados por parâmetros outros que não a simples localização geopolítica do riacho analisado

Figura 43. Modelo de equações estruturais considerando Brasil e Paraguai como variáveis preditoras da riqueza e abundância de peixes, riqueza de macroalgas e diatomácea. As setas vermelhas representam rotas com efeito negativo que foram significativas ($p < 0.05$ piecewise SEM). As setas cinza-claro representam rotas não significativas ($p > 0.05$). A espessura das setas indica a magnitude do coeficiente de regressão padronizado ou o effect size (efeito padronizado), valores indicados nas setas. R^2 para os componentes do modelo estão indicados nas variáveis endógenas.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 63 de 92



3.43 Conclusão

Como previamente levantado nas hipóteses, foi encontrada menor riqueza e abundância de peixes em riachos brasileiros circundados por maior área de agricultura. Contudo, não foram corroboradas as hipóteses propostas em relação à influência dos micropoluentes, da qualidade da água e da heterogeneidade na biodiversidade, pois não houve influência direta nem indireta destas variáveis nos táxons testados. Dessa forma, durante a vigência deste projeto, ao avaliar os efeitos dos micropoluentes, das mudanças na paisagem e dos parâmetros físico-químicos da água para a biodiversidade de riachos neotropicais transfronteiriços, foi possível evidenciar resultados que poderão auxiliar a criação e o fortalecimento de políticas socioambientais integradas entre Brasil e Paraguai, garantindo, assim, a provisão dos serviços ecossistêmicos pela biodiversidade, bem como a preservação de espécies potencialmente ameaçadas. Tendo em vista que a biodiversidade mundial é cada vez mais ameaçada por ações e práticas humanas, ao considerar os efeitos causados por fatores antrópicos atrelados à parâmetros de qualidade ambiental é possível compreender de maneira holística os processos causadores do declínio tanto populacional quanto das espécies. Algo efetivamente possibilitado pelo projeto em questão através dos resultados obtidos.

Maiores resultados e esclarecimentos podem ser consultados no relatório de finalização do subprojeto 2 disponível no [NITdocs](#).

Meta 4

4.1 Implementação do experimento

A proposição dos experimentos a serem realizados tanto para degradação por fungos quanto para a degradação anaeróbia de atrazina e, nesse último caso também de 2,4-D, contaram com extensa revisão da literatura e expertise e estrutura laboratorial das Universidades colaboradoras (UNILA e UNIFAL). Baseados

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 64 de 92

nisso, foram adquiridos equipamentos (shaker e trado) e os consumíveis necessários para a avaliação da diversidade genética e funcional de fungo, montagem de microcosmos e a análise da interação entre o microbioma (bactérias e fungos) do solo e a atividade de micropoluentes na cultura da soja usando a metodologia de metabarcoding diretamente do sistema agrícola além do enriquecimento e montagem do biorreator anaeróbio horizontal de leito fixo. Além disso, dentro dessa meta foi possibilitado o estudo da dinâmica de glifosato em sedimento, realizado em parceria com a UFABC e UNILA.

4.2 Coleta de amostras

Para o desenvolvimento dessa meta do projeto, o local selecionado para coleta de solo está localizado no limite da Bacia do Paraná 3 (BP3), na sub Bacia Hidrográfica Sanga Memória (24°48'51"S e 53°33'24"O), na cidade de Toledo, Paraná, Brasil (Figura 44). A primeira coleta realizada em setembro de 2018 antedeu as necessidades experimentais relacionadas aos experimentos com fungos (avaliar a diversidade genética e funcional de fungos filamentosos) e bactérias anaeróbias (montagem de biorreatores anaeróbios). As próximas coletas de solo realizadas em fevereiro de 2019 e posteriormente, em setembro e dezembro de 2021 e janeiro e fevereiro de 2022 foram realizadas para avaliação da interação entre o microbioma do solo e a atividade de micropoluentes na cultura da soja. Na área selecionada para o estudo utiliza o sistema de tratamento agrícola de terraceamento, o qual busca evitar as erosões do solo e manter a produtividade em áreas íngremes.

Figura 44. 1) Localização da Bacia Hidrográfica Sanga Memória, na cidade de Toledo para coleta de amostras de solo; 2) Amostragem do solo agrícola e estágio do cultivo. A) T1: 17 de setembro de 2021; B) T2: 21 de dezembro de 2021; C) T3: 31 de janeiro de 2022; e D) T4: 21 de fevereiro de 2022 na região de Toledo/PR; 3) Coleta de amostras de sedimento no reservatório de Itaipu.

1.



Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 65 de 92

2.



3.



A amostra coletada para extração do DNA e envio para as análises físico-químicas foi preservada à -80°C . Para as análises de glifosato em sedimento, as coletas foram realizadas seguindo o mesmo calendário da Meta 3 de acordo com as normas descritas no Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras da Agência Nacional de Águas (ANA, 2011). Os sedimentos foram coletados na zona de deposição de sedimento, colocados em sacos plásticos estéreis e mantidos sob refrigeração até a chegada ao laboratório. Parte do sedimento in natura foi enviado a UFABC para realização dos ensaios de caracterização e o restante foi congelado a -20°C e liofilizado no laboratório Ambiental da Itaipu.

4.3 Análises laboratoriais

4.3.1 Diversidade genética e funcional de fungos filamentosos em solo contaminado com atrazina em um sistema de microcosmo

4.3.1.1 Microcosmos

Nove microcosmos foram preparados com 500 g de solo e organizados em três sistemas: controle (sem adição de ATZ), T1 (suplementado com 300 ng de ATZ kg^{-1} de solo) e T2 (suplementado com 3000 ng de ATZ kg^{-1} de solo), em triplicata. Os microcosmos foram incubados a 28°C , e o isolamento fúngico realizado a cada sete dias, durante 28 dias (0, 7, 14, 21, 28), em meio de cultivo Extrato de Malte 2% (MA2) e MA2 suplementado com guaiacol (para isolamento de fungos ligninolíticos, MA2G). A amostra de solo antes da montagem dos microcosmos apresentou 0,02 mg ATZ kg^{-1} de solo e entre os fatores químicos e físicos avaliados destaca-se o pH alcalino e alta concentração de fósforo.

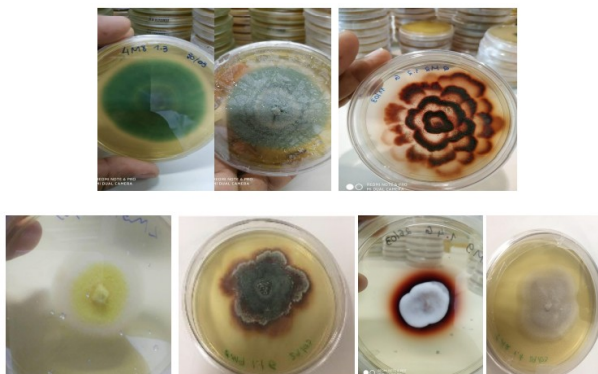
Relatório de Cumprimento do Objeto

Figura 45. Microcosmos montados e armazenados em estufa



Infelizmente, não foi possível quantificar atrazina e seus principais metabólitos nos níveis de concentração praticados pelo método desenvolvido devido a baixa concentração utilizada na fortificação da amostra de solo. Os isolados foram caracterizados morfológicamente para obter o número de morfoespécies e o sequenciamento da região ITS do DNAr permitiu a identificação taxonômica da comunidade geral (meio de cultivo MA2) e comunidade ligninolítica (meio de cultivo MA2G com atividade enzimática).

Figura 46. Alguns dos morfotipos de fungos encontrados nos solos processados



No total 114 morfoespécies foram isoladas, destes 52% ocorreram em mais de um tratamento, 38% aparecem uma única vez e 27% das morfoespécies ocorreram em todos os tratamentos, em destaque as morfoespécies R14 e R28 que apareceram em quase todas as coletas. Na intercessão entre os tratamentos 1 e 2 temos 7 morfoespécies que são exclusivas na presença de ATZ, o que pode indicar que esses indivíduos possuem uma afinidade com a ATZ capazes de tolerar tanto baixa como alta concentração, o que evidencia uma possível especialização e por possuírem uma afinidade tão grande que só ocorrem na presença da ATZ, podendo ser capazes de assimilar ou até mesmo decompor a ATZ.

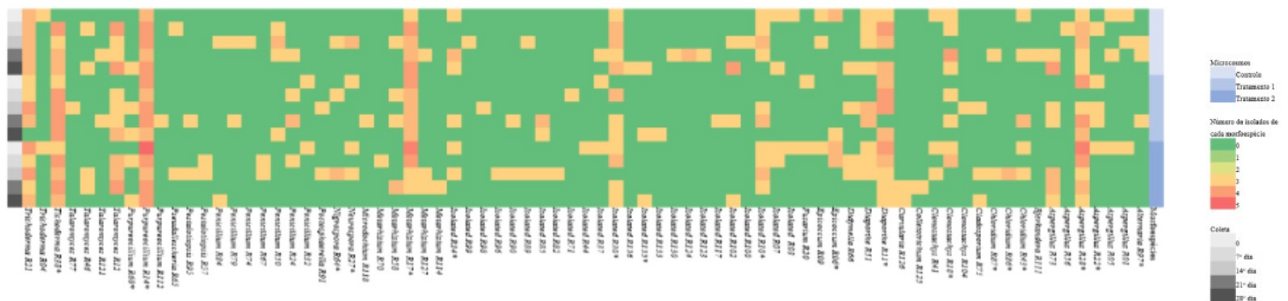
Para a atividade ligninolítica 24 morfoespécies foram positivas ao reagente guaiacol, destas 21% ocorreram em todos os tratamentos enquanto 63% foram exclusivas por tratamentos. Apesar de ter uma baixa ocorrência, os fungos ligninolíticos são bem generalistas sendo encontrados em todos os tratamentos e apesar de muitos estudos demonstrarem que os fungos ligninolíticos são capazes de degradar a ATZ, o consórcio de fungos produtores de enzimas ligninolíticas apresentam uma maior atividade enzimática e conseqüentemente uma maior degradação da ATZ. Fatores como a quantidade de enzimas produzidas, tipo do solo e pH irão afetar significativamente a degradação da ATZ, bem como as mudanças de longo prazo nas propriedades

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 67 de 92

químicas do solo podem afetar seu equilíbrio biológico e químico e conseqüentemente a atividade desses microrganismos do solo. De maneira geral, houve predominância de fungos do filo Ascomyceto e o processo de sucessão biológica foi identificado, destacando alguns gêneros de maior impacto, principalmente entre o sétimo e o 14º dia, como os gêneros *Purpureocillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Metarhizium* sp., que são antagonistas fúngicos

Figura 47. Ocorrência e abundância de morfoespécies das comunidades de fungos nos sistemas de microcosmo (Controle, Tratamento 1 e Tratamento 2). Controle (sem adição de ATZ), T1 (suplementado com 300 ng de ATZ kg⁻¹ de solo) e T2 (suplementado com 3000 ng de ATZ kg⁻¹ de solo). *Fungos positivos para a reação guaiacol (atividade ligninolítica)

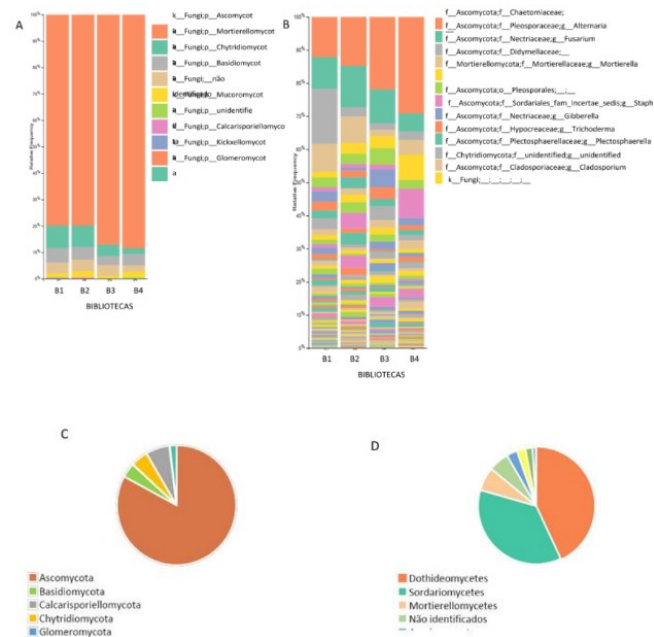


A comunidade independente de cultivo dos microcosmos foi avaliada pelo sequenciamento de nova geração (Illumina MiSeq). As amostras foram enviadas para análise e após todo o processamento de bioinformática das bibliotecas foram confiantemente detectadas e identificadas: 31236, 19870, 13348, 19715 ESVs (sequência exata variante) das bibliotecas 1, 2, 3 e 4 respectivamente, totalizando 84169 ESVs. O número de ESVs recuperadas foi altamente representativo, indicando uma boa cobertura amostral. Foram obtidos oito filos distribuídos em 119 gêneros. O filo Ascomycota foi altamente representativo em todos os tratamentos, em média 88% de todas as ESVs encontradas, seguido dos filos Mortierellomycota (6%), Chytridiomycota (4,5%) e Basidiomycota (3,8%). O número de basidiomicetos recuperados foi muito baixo explicando a baixa incidência reportada no isolamento. Na Figura 48 estão os gráficos gerados para ilustrar a diversidade obtida.

Figura 48. Distribuição taxonômica das EVSs obtidas no metabarcoding: A) Frequência relativa de filos entre as bibliotecas; B) Frequência relativa de gêneros entre as bibliotecas (a legenda contém os 12 principais gêneros); C) Frequência total dos filos; D) Frequência total das classes. Biblioteca 1 (microcosmo controle, tempo zero); Biblioteca 2 (microcosmos controles após 28 dias de incubação); Biblioteca 3 (microcosmos suplementados com 300 ng de ATZ kg⁻¹ de solo após 28 dias de incubação) e; Biblioteca 4 (microcosmo suplementado com 3000 ng de ATZ kg⁻¹ de solo após 28 dias)

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 68 de 92



Conclui-se que o uso do sistema de microcosmo foi eficiente para o estudo da comunidade microbiana do solo e permitiu avaliar o efeito da ATZ na dinâmica da comunidade ao longo de 28 dias de incubação. Analisando a composição, a diversidade beta, a caracterização taxonômica, e o agrupamento funcional conclui-se:

- Dominância de fungos do Filo Ascomycota; Baixa abundância do Filo Basidiomycota;
- O isolamento não conseguiu recuperar fungos presente em abundância baixa representantes de outros filios identificados no metabarcoding;
- O isolamento favoreceu grupos de crescimento rápido;
- O processo de sucessão biológica foi identificado especialmente entre sete a 14 dias de incubação, indicando o momento crucial do sistema;
- A comunidade fúngica estudada é altamente adaptada e dependentes da ATZ;
- A comunidade fúngica e especialmente os fungos ligninolíticos podem estar envolvidos com os processos de degradação acelerada da ATZ, resultando inclusive na dissipação rápida do agrotóxico;
- O envolvimento ligninolítico no processo ocorre independente do filo, com predominância de ascomicetos; A maioria dos táxons possuem atividade saprofítica, em especial destacamos o gênero *Alternaria*, como o grupo de maior abundância, e positivo pra atividade ligninolítica;
- Na sucessão biológica houve supressão dos patógenos animais e vegetais;
- Identificação de uma sequência da família Didymellaceae como potencial patógeno vegetal desconhecido;
- Significativo impacto do gênero *Mortierella* na degradação da ATZ.

4.3.1.2 Interação entre o microbioma do solo e a atividade de micropoluentes na cultura da soja

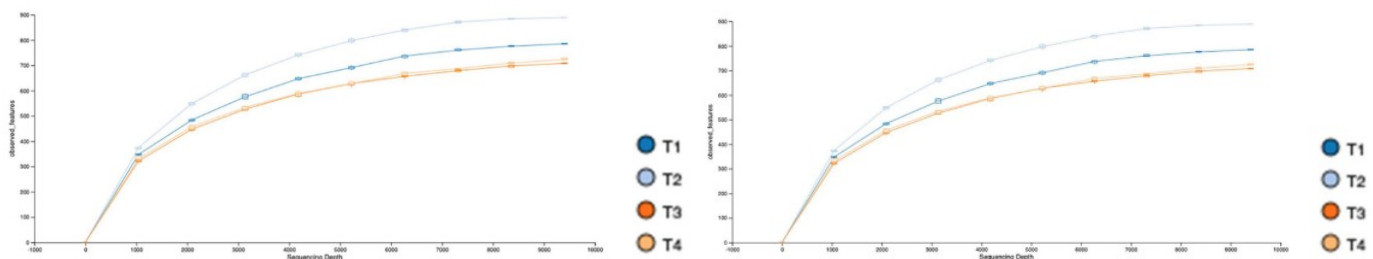
Nesse estudo, foram realizadas quatro coletas ao longo do cultivo da soja, *Glycine max*, em setembro e

Relatório de Cumprimento do Objeto

dezembro de 2021 e janeiro e fevereiro de 2022, respectivamente. As amostras foram coletadas em tempos diferentes em relação ao crescimento e desenvolvimento do cultivo agrícola, sendo a primeira coleta antes da plantação da soja (T1), a segunda e terceira coleta referem-se respectivamente ao tempo 2 e 3 (T2 e T3), sendo T3 com a plantação já mais desenvolvida e próxima da colheita e por último tem-se o tempo 4, após a colheita em fevereiro de 2022 (T4).

Foi realizada através da bioinformática, pelo método do DNA barcoding, que identifica os organismos através de regiões genômicas. As curvas de rarefação apresentadas nas Figuras 49, indicam uma cobertura amostral completa e expressiva, dado o platô alcançado pela curvatura. Dessa forma é possível constatar que as coletas realizadas foram suficientes para a obtenção de todas as sequências no espaço experimental, resultando na riqueza de OTUs entre as coletas, ao longo dos tempos.

Figura 49. Curva de rarefação da amostra para nível de similaridade de 99% e profundidade de mais de 22.000 sequências, da análise metagenômica ITS (esquerda) e profundidade de mais de 9.000 sequências, da análise metagenômica V3-V4 (direita)

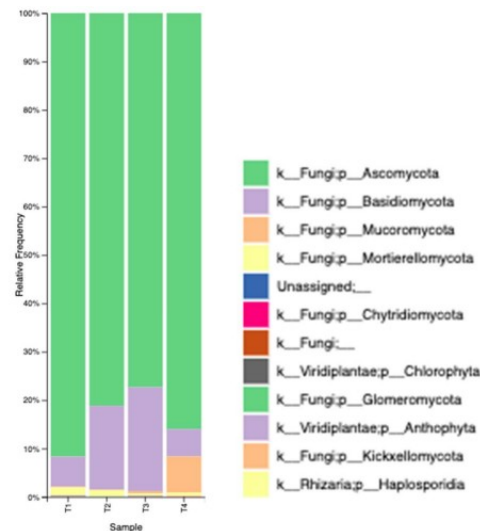


Após as análises de bioinformática obteve-se 737 OTUs de fungos, distribuídas em sete Filos. O Filo Ascomycota foi o mais abundante, seguido por Basidiomycota, Mortierellomycota e Mucoromycota (Figura 50).

Figura 50. Ocorrência e abundância de OTUs da comunidade de fungos, comparando frequência relativa dos filios relevantes detectados na amostra nos diferentes tempos de coleta

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 70 de 92



Quando se compara a frequência desta ampla variabilidade de fungos, em relação com os tempos distintos de coleta das amostras, percebe-se que fungos Ascomycota estão com alta frequência e representados em todos os tempos (T1, T2, T3 e T4) e com dominância sobre os demais, porém, sofre uma diminuição considerável nos tempos T2 e T3. Em contraponto, aumenta a frequência de fungos Basidiomycota nesses tempos. No tempo T4 quando a frequência de Ascomycota volta a aumentar, a abundância do Filo Basidiomycota diminui consideravelmente, e aumenta também de forma abrupta a frequência do filo Mucoromycota, que não estava significativamente representado no T1, mas começa aumentar sua frequência em T3. Mortierellomycota estava pouco presente em T1 e foi diminuindo sua frequência sucessivamente nos outros tempos. Os demais filis por terem poucos representantes, não apresentam importância analítica relevante e, portanto, não aparecem representados nas figuras.

A comunidade fúngica alterou em função dos diferentes tempos de coleta como esperado devido a variação do crescimento vegetal e interferência humana no cultivo (adição de agroquímicos). De um modo geral, as diferenças observadas entre os tempos de coleta estão relacionadas com a escassez de nutrientes ao longo do desenvolvimento do cultivo agrícola, que são absorvidos pela própria soja.

Essa dinâmica pode ser explicada pela Lei do mínimo de Liebig, onde o fungo requer uma certa quantidade da ATZ para que consiga se desenvolver, substituindo assim um composto insuficiente do ambiente por outro quimicamente relacionado (ODUM & BARRET, 2011), o que acaba proporcionando a degradação do herbicida, consumido pelos fungos. A grande maioria dos fungos encontrados em todas as coletas, são considerados saprófitos, no qual degradam a matéria orgânica morta e sua importância é evidenciada na reciclagem de nutrientes, porém foram detectados muitos fungos parasitas de microrganismos patogênicos, como o gênero *Clonostachys*.

O T4 é o tratamento que mais difere, indicando uma composição bem diferente em comparação com os demais, principalmente em relação a T1, essa diferença provavelmente se deve ao tipo de cultivo anterior à soja, no caso do estudo o milho. Ou seja, a comunidade fúngica no T1 pode estar mais relacionada com a plantação de milho, que sofre sucessão ecológica com o cultivo da soja.

Para a comunidade de bactérias, foram identificadas 8152 OTUs para bactérias, classificadas em 30 Filos,

Relatório de Cumprimento do Objeto

pertencentes majoritariamente ao filo Actinobacteriota, Proteobacteria, Acidobacteriota e Chloroflexi. Ao contrário do observado para fungos, a diferença na diversidade bacteriana entre os tempos não é clara. As coletas T1, T3 e T4 estão mais relacionados em composição que a coleta no tempo T2. A coleta T2 corresponde ao cultivo da soja no seu estágio inicial. Possivelmente, há uma mudança no solo que possa indicar essa alteração neste tempo, que depois se mantém estável. A maior diversidade bacteriana encontrada no T2 que corresponde ao momento após o plantio do monocultivo, pode ser explicada pela maioria dos representantes serem fixadores de nitrogênio, estando diretamente atrelados com a presença do vegetal e a adubação e fertilização do solo.

As análises estatísticas confirmar os dados que fungos e bactérias respondem de maneira diferente ao longo da safra, e que apesar dos sinergismos entre os grupos, os fatores envolvidos com a variação e sucessão biológica entre fungo e bactérias são completamente diferentes.

Comparando o sistema de microcosmos (in vitro e sem cultivo vegetal) e a análise da comunidade de fungos diretamente do DNA ambiental, podemos concluir que possivelmente o efeito dos micropoluentes na comunidade de fungos é mínimo. As sucessões biológicas e variações nos índices de diversidade estão mais relacionados com a espécies vegetais e as características físicas e químicas do solo.

O estudo foi realizado no horizonte orgânico (matéria orgânica solta e parcialmente decomposta, horizonte O) e no horizonte A (matéria mineral misturada com algum húmus), região de grande importância para a comunidade fúngica aeróbica, nessa região, com base no estudo, a hipótese do projeto foi confirmada, em que a aplicação repetida tem resultado em exposição a longo prazo dos micro-organismos do solo, gerando baixos níveis de resíduos e de metabólitos relacionados aos micropoluentes, e às vezes levando a um aprimoramento gradual de resistência das comunidades.

Porém, a presença de fungos resistentes à ATZ com grande predominância de fungos ascomicetos conhecidos pela capacidade de redundância funcional, variando entre saprófitos e fitopatógenos, não resulta em um solo saudável. Neste sentido, como a capacidade do solo agrícola em realizar os processos de transformação, retenção e transporte da ATZ estão ligados ao potencial de biodegradação da microbiota, quando a microbiota é ativa, rapidamente consegue responder a entrada do poluente. Por outro lado, quando a microbiota não responde aos efeitos dos herbicidas, como observado no estudo, esses ficam disponíveis no solo para reações físicas e químicas ou são imediatamente lixiviados. A lixiviação está altamente atrelada ao processo de sorção da ATZ, que acontece especialmente em solo com altos índices de substâncias húmicas na matéria orgânica. Assim, a presença do herbicida e seus metabólitos em sedimento, água subterrâneas e superficiais pode estar diretamente relacionado com a ausência de interação do poluente com a comunidade fúngica, como resultado da resistência e baixa biodegradabilidade.

4.3.2 Biodegradação anaeróbia

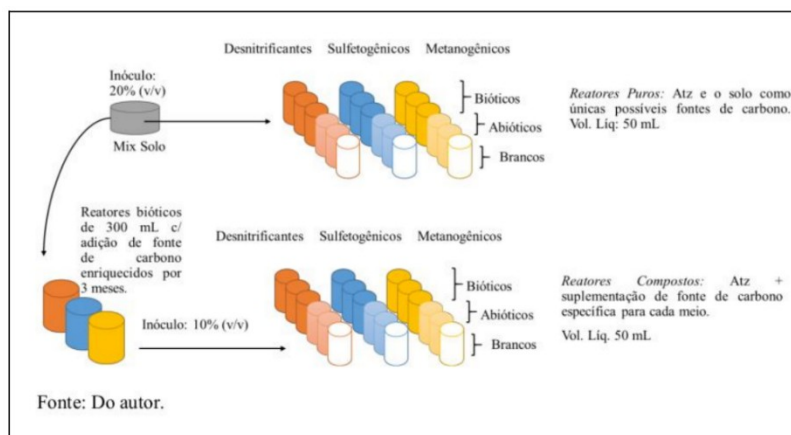
4.3.2.1 Herbicida Atrazina

Foram montados os meios de cultura um total de 21 reatores. Para cada uma das 3 condições de oxirredução (desnitrificantes, sulfetogênicos e metanogênicos) foram feitos 7 reatores: 3 bióticos, sendo a atrazina e o conteúdo orgânico do solo as únicas fontes de carbono dos reatores; 2 abióticos, com adição de azida 1M

Relatório de Cumprimento do Objeto

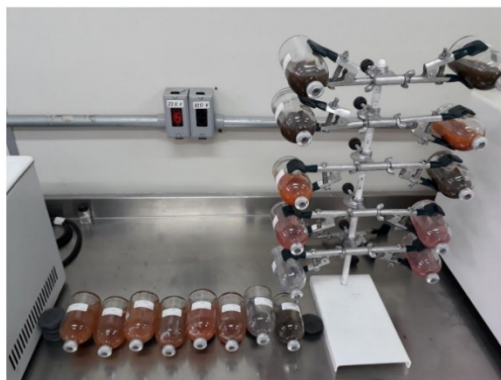
(NaN_3) e cloreto de mercúrio 1M (HgCl_2), para inativação microbiana, e 1 “branco”, sem adição de atrazina. A Figura 51 mostra o arranjo experimental dos reatores anaeróbios, que foram divididos em Reatores Puros Anaeróbios (RPA) e Reatores Compostos Anaeróbios (RCA).

Figura 51. Procedimento experimental do enriquecimento dos reatores anaeróbios



Os reatores bióticos foram preparados para avaliar a atividade microbiana (crescimento e degradação da atrazina), os abióticos para verificar a degradação da atrazina sem a participação microbiana, e o “branco” para observar se os microrganismos envolvidos no processo de degradação da atrazina estão se desenvolvendo (ou não) a partir de outras fontes de carbono (o que foi adicionado nos reatores de 300 mL, ou conteúdo orgânico do solo). O experimento de degradação da atrazina em determinado período e foram coletadas mensalmente amostras para determinação da quantidade de atrazina e seus intermediários metabólicos de degradação, assim como para determinação dos parâmetros físico-químicos que apontam a atividade microbiana. Os reatores de volume líquido de 300 mL são mostrados pela Figura 52. E os reatores com volume líquido de 50 mL, com as amostras coletadas a partir dos experimentos realizados (reatores metanogênicos, sulfetogênicos e desnitrificantes) foram monitoradas em relação a sulfato e sulfeto, ao consumo de nitrato e a degradação de atrazina, com e sem fonte de carbono.

Figura 52. Reatores de 50 mL com fonte de carbono.



A análise cromatográfica de ATZ, DIA e DEA foram realizadas no HPLC, Thermo Ultimate 3000 empregando acetonitrila grau HPLC e água ultrapura (60:40) em um método isocrático de 8 minutos. Os tempos de

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 73 de 92

retenção do analitos foram de 3,03, 3,38 e 5,38 min para DIA, DEA e ATZ, respectivamente, monitorados no comprimento de onda monitorado de 220 nm. Os resultados obtidos para as amostras analisadas depois de um período de 70 dias estão na Tabela 9.

Tabela 9. Concentrações obtidas para a quantificação de atrazina e metabólitos nas amostras dos bioreatores

Amostra	Concentração mg L ⁻¹			Amostra	Concentração mg L ⁻¹		
	DIA	DEA	ATZ		DIA	DEA	ATZ
T2 com desnitrificante A1D	nd	<0,025	0,139	T2 sem metanogênica W0M	<0,025	<0,025	nd
T2 com desnitrificante A2D	nd	nd	<0,050	T3 sem metanogênica A1M	0,0552	<0,025	<0,050
T2 com desnitrificante B1D	nd	nd	0,415	T3 sem metanogênica A2M	0,0462	<0,025	0,0555
T2 com desnitrificante B2D	nd	nd	0,545	T3 sem metanogênica B1M	0,0375	<0,025	0,0880
T2 com desnitrificante B3D	nd	nd	0,487	T3 sem metanogênica B2M	0,0620	<0,025	0,0880
T2 com desnitrificante W0D	nd	nd	nd	T3 sem metanogênica B3M	0,0455	<0,025	0,0758
A1D desnitrificante FC0	nd	nd	0,150	T3 sem metanogênica W0M	0,0745	<0,025	<0,050
A2D desnitrificante FC0	nd	nd	0,0622	T4 sem metanogênica A1M	nd	nd	0,0514
B1D desnitrificante FC0	nd	nd	0,730	T4 sem metanogênica A2M	nd	nd	<0,050
B2D desnitrificante FC0	nd	nd	0,681	T4 sem metanogênica B1M	0,0304	<0,025	0,0802
B3D desnitrificante FC0	nd	nd	0,619	T4 sem metanogênica B2M	0,0492	<0,025	0,0805
W0D desnitrificante FC0	nd	nd	<0,050	T4 sem metanogênica B3M	0,0733	<0,025	0,0796
T2 sem desnitrificante A1D	0,0379	<0,025	<0,050	T4 sem metanogênica W0M	nd	nd	nd
T2 sem desnitrificante A2D	0,0613	<0,025	<0,050	T2 com sulfetogênica A1S	nd	nd	0,510
T2 sem desnitrificante BGD	0,0409	<0,025	<0,050	T2 com sulfetogênica A2S	0,0278	nd	0,552
T2 sem desnitrificante W0D	<0,025	<0,025	nd	T2 com sulfetogênica B1S	nd	nd	0,114
T3 sem desnitrificante A1D	0,0300	0,0126	<0,050	T2 com sulfetogênica B2S	nd	nd	0,229
T3 sem desnitrificante A2D	0,0586	0,0164	<0,050	T2 com sulfetogênica B3S	nd	nd	0,0906
T3 sem desnitrificante B1D	0,0650	0,0088	0,069	T2 com sulfetogênica W0S	nd	nd	nd
T3 sem desnitrificante B2D	0,0447	0,0088	0,054	A1S sulfetogênica FC0	nd	nd	0,597
T3 sem desnitrificante B3D	0,0756	0,0099	0,064	A2S sulfetogênica FC0	nd	nd	0,633
T3 sem desnitrificante W0D	0,0519	0,0088	<0,050	B1S sulfetogênica FC0	nd	nd	0,594
T4 sem desnitrificante A1D	<0,025	<0,0250	<0,050	B2S sulfetogênica FC0	nd	nd	0,714
T4 sem desnitrificante A2D	0,0375	<0,0250	<0,050	B3S sulfetogênica FC0	nd	nd	0,594
T4 sem desnitrificante B1D	0,0530	0,0252	0,145	W0S sulfetogênica FC0	nd	nd	nd
T4 sem desnitrificante B2D	0,0443	<0,0250	0,124	T2 sem sulfetogênica A1	nd	nd	<0,050
T4 sem desnitrificante B3D	0,0375	<0,0250	0,129	T2 sem sulfetogênica A2	0,0330	nd	<0,050
T4 sem desnitrificante W0D	0,0571	<0,0250	<0,050	T2 sem sulfetogênica B1	<0,025	<0,035	0,103
T2 com metanogênica A1M	nd	nd	nd	T2 sem sulfetogênica B2	nd	nd	nd
T2 com metanogênica A2M	nd	nd	nd	T2 sem sulfetogênica B3	0,0270	<0,025	0,123
T2 com metanogênica B1M	nd	nd	nd	T2 sem sulfetogênica BG	nd	<0,025	nd
T2 com metanogênica B2M	nd	nd	nd	T2 sem sulfetogênica W0	0,0259	<0,025	<0,050
T2 com metanogênica B3M	nd	nd	nd	T3 sem sulfetogênica A1S	0,0334	<0,025	nd
T2 com metanogênica W0M	nd	nd	nd	T3 sem sulfetogênica A2S	0,0319	<0,025	nd
A1M metanogênica FC0	nd	nd	nd	T3 sem sulfetogênica B1S	0,0534	<0,025	0,117
A2M metanogênica FC0	nd	nd	nd	T3 sem sulfetogênica B2S	0,0462	<0,025	0,138
B1M metanogênica FC0	nd	nd	<0,050	T3 sem sulfetogênica B3S	0,0504	<0,025	0,089
B2M metanogênica FC0	nd	nd	<0,050	T3 sem sulfetogênica W0S	0,0443	<0,025	nd
B3M metanogênica FC0	nd	nd	0,076	T4 sem sulfetogênica A1S	nd	nd	nd
W0M metanogênica FC0	nd	nd	<0,050	T4 sem sulfetogênica A2S	nd	nd	nd
T2 sem metanogênica A1M	0,0677	<0,025	0,0819	T4 sem sulfetogênica B1S	nd	nd	0,120
T2 sem metanogênica A2M	0,0552	<0,025	0,0839	T4 sem sulfetogênica B2S	nd	nd	0,145
T2 sem metanogênica B1M	0,0632	<0,025	0,105	T4 sem sulfetogênica B3S	nd	nd	0,0883
T2 sem metanogênica B2M	0,0952	<0,025	0,112	T4 sem sulfetogênica W0S	nd	nd	nd
T2 sem metanogênica B3M	nd	nd	nd				

A partir dos resultados obtidos, pode se observar que existe diferença nos processos aplicados para a degradação de ATZ, estes processos dependem de condições ambientais específicas, como ação microbiana e condições físico-químicas do ambiente, além de características intrínsecas deste herbicida.

Os resultados dos ensaios tendo a ATZ e o conteúdo orgânico do solo como únicas fontes de carbono para as bactérias nos reatores, apontam que variação de remoção da atrazina foi pouco significativa (87% para a

Relatório de Cumprimento do Objeto

condição desnitrificantes, 88% para a sulfetogênica e 92% para a metanogênese). Entretanto os resultados encontrados em reatores suplementados com fontes complementares de carbono (de acetato para os reatores desnitrificantes, lactato para os sulfetogênicos e acetato e formiato para os metanogênicos) indicam alta remoção de ATZ: 100% em até 70 dias.

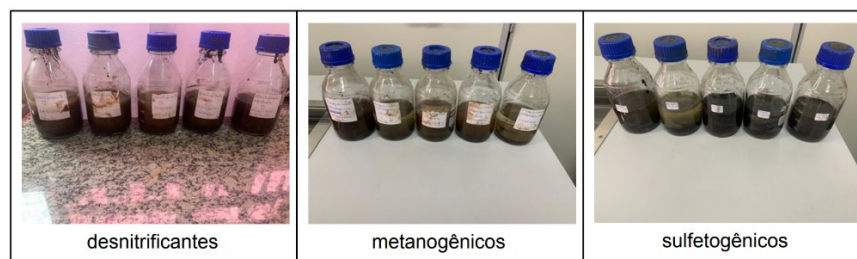
Em todos os Reatores Compostos Anaeróbios (RCA) pôde-se perceber rápida remoção de ATZ (RCM>RCD>RCS). Estes resultados revelam que estudos envolvendo a degradação desse composto em condições com bactérias enriquecidas/adaptadas e inoculadas em reatores suplementados com outras fontes de carbono deve ser estudado em intervalo de tempo menor do que o estudo de reatores sem enriquecimento prévio e suplementação. Uma vez que, no primeiro caso a concentração celular é muito superior e, provavelmente, o metabolismo mais acelerado.

Outro fato importante a ser destacado é que não houve detecção de intermediários metabólicos da ATZ em nenhum dos RCA estudados, o que pode ser mais um indicador de que os processos de degradação foram tão rápidos que nem a detecção de intermediários metabólicos foi possível.

4.3.2.2 Herbicida 2,4-D

O sedimento coletado em três diferentes pontos da sub Bacia Hidrográfica Sanga Memória, com duas subcamadas cada, foi utilizado como inóculo nos ensaios de degradação anaeróbia do 2,4D. A preparação do inóculo e arranjo experimental está no [NITdocs](#). As atividades metabólicas dos reatores (Figura 53) foram monitoradas semanalmente, através de coleta de amostra líquida do ensaio, a partir do consumo da matéria orgânica (DQO) e da produção do metano (CH₄), os quais refletem a presença de atividade biológica metanogênica ativa.

Figura 53. Reatores de enriquecimento



Na primeira fase com duração de 166 dias de operação, a triplicata de reatores bióticos 1, 2 e 3 alcançaram, respectivamente, uma remoção de DQO com eficiência de 61,25%, 94,82 % e 94,89%, fazendo necessário a manutenção do meio no 87º dia de operação, através da adição de fontes de carbono, Lactato e Acetato, nos mesmos volumes adicionados originalmente no preparo do meio. Abaixo, na Figura 54, é apresentado graficamente o decaimento de DQO durante o período de operação referente a primeira fase de enriquecimento, assim como na Figura 55, é exposta a quantificação do metano produzido nos primeiros 76 dias, após esse período a produção se manteve contínua e crescente, extrapolando a capacidade máxima de conversão na curva de calibração, não podendo ser mensurado. Na fase 2 de enriquecimento em um único reator biótico, teve duração de 210 dias e mostrou-se igualmente eficiente na remoção da DQO, com

Relatório de Cumprimento do Objeto

decaimento acentuado e expressivo, necessitando de periódicas manutenções com adições de fontes de carbono, de maneira idêntica ocorrida na fase 1.

Figura 54. Representação gráfica do decaimento da concentração de matéria orgânica (DQO) consumida em relação ao tempo em dias, durante a fase 1 (esquerda) e fase 2 (direita) de enriquecimento.

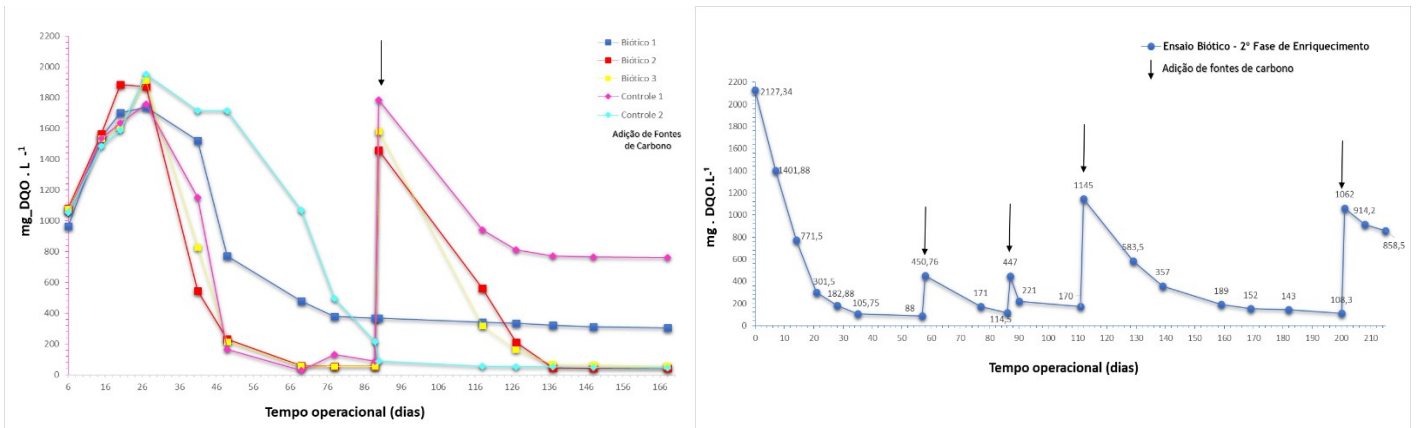
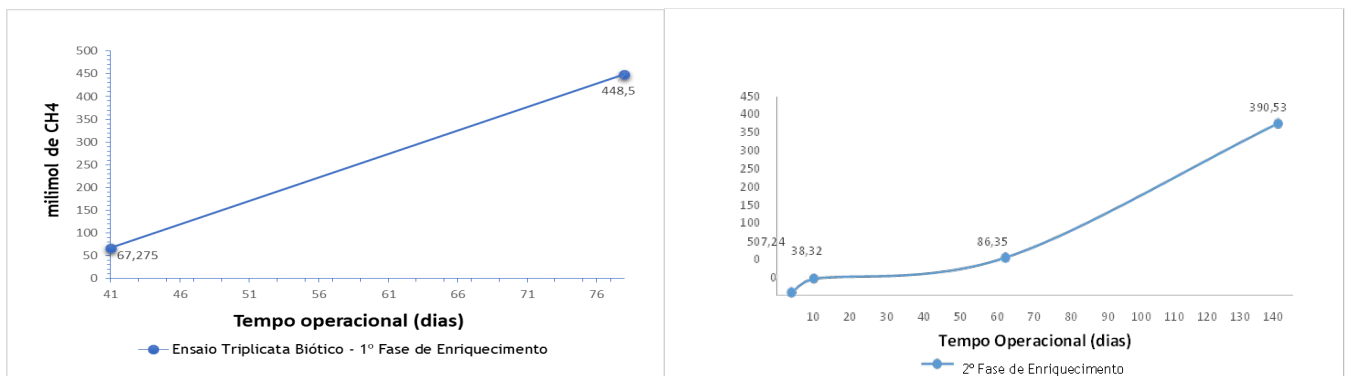


Figura 55. Representação gráfica da variação volumétrica média da concentração de gás metano (CH₄), produzido em relação ao tempo em dias durante a 1ª Fase (esquerda) e 2ª Fase (direita) de enriquecimento nos meios bióticos sob condição metanogênica



A produção de metano tanto na fase 1, quanto na fase 2, pode ser diretamente relacionada ao consumo de matéria orgânica, reafirmando a ocorrência de atividade microbiana metanogênica ativa e o sucesso do enriquecimento em propiciar o desenvolvimento de atividades biológicas das mesmas.

Similar ao comportamento na primeira fase, também através da cromatografia líquida foi detectado concentrações traços de 4CP, proveniente da conversão do 2,4D. Na amostra coletada 3 dias após o preparo do meio de enriquecimento, foi quantificado a concentração de 0,32 mg/L de 2,4D e no 66º dia de operação, esse composto não foi mais detectado, logo, infere-se que o 2,4D foi consumido e convertido em 4CP, composto este presente na concentração de 0,40 mg/L na mesma data. Tais resultados mostram que a biomassa enriquecida ao longo dos 376 dias comprovou-se apta a degradar o 2,4D por meio de seu

Relatório de Cumprimento do Objeto

metabolismo

Com base nisso, adequou-se o sistema reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada de 5L inoculado com o sedimento (10%) previamente enriquecido nos frascos-reatores em triplicata, exemplo pode ser visto na Figura 56.

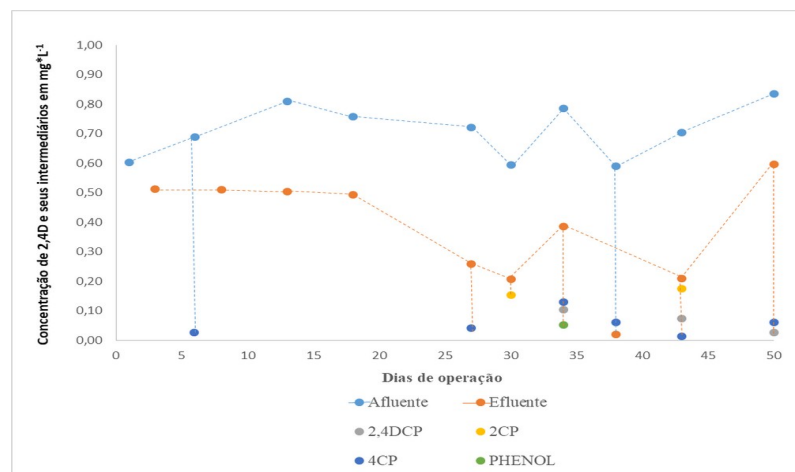
Figura 56. RAHLF após inoculação com formação de biofilme na coloração escura no suporte fixo.



O pico de eficiência no 43º dia de operação, última amostra retirada para análise de DQO, com 91%, em oposição a menor eficiência medida neste período, no 27º dia, com 82%. A constância e eficiência alta na degradação de DQO certificou a biorremediação em relação ao DQO, descartando a possibilidade de que a cultura microbiana não tivesse sido aderida ao suporte fixo do reator e/ou não estivesse desempenhando suas funções metabólicas caso não ocorresse a degradação do 2,4D. A cultura microbiana presente no reator está apta e em atividade metabólica.

Em relação a eficiência de degradação do herbicida 2,4D no RAHLF foi comprovado remoção eficiente do 2,4D em absolutamente todas as amostras coletadas durante a operação do RAHLF, na ordem entre 14,79 a 96,52% de eficiência de biorremediação do composto.

FIGURA 57. Concentração de 2,4D e intermediários (2,4DCP, 2CP, 4CP e Phenol) das amostras afluentes e efluentes retiradas durante a operação RAHLF.



Os resultados apresentados nesse trabalho, mostraram êxito ao evidenciar o potencial de degradação sob

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 77 de 92

condições metanogênicas, com Acetato de Potássio e Lactato de Sódio, como substratos orgânicos do herbicida 2,4D na concentração de 1 mg L^{-1} , pelos microrganismos autóctones provenientes do sedimento do Reservatório de Itaipú-PR, os quais comprovaram-se adequados na biodegradação do composto em estudo, logo, fez ser verdade a afirmação de que culturas pré-exposta ao contaminante propendem a evoluir maior capacidade de remoção do mesmo. A rota considerada para a degradação do 2,4D neste trabalho, passou se pelo 2,4DCP, 2CP, 4CP e por fim, chegando no Phenol.

4.3.3 Análise de glifosato e AMPA em amostras de sedimento em riachos

A qualidade dos sedimentos também é um parâmetro importante na avaliação da qualidade da água, uma vez que eles podem servir como reservatório de substâncias químicas e microrganismos com potencial em afetar negativamente a qualidade da água. Dentre as substâncias químicas presentes nos sedimentos, o glifosato (Gly) e o seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) têm recebido atenção especial, devido à sua alta utilização em atividades agrícolas.

4.3.3.1 Caracterização das amostras de sedimento

Nas amostras da 1ª e 3ª coleta de sedimento (Figura 58) foram realizadas as análises de caracterização de cada ponto coletado seguindo os parâmetros: granulometria pelo método de peneiramento (ASTM, D2487-00), análise de pH (ASTM D4972-95a), teor de matéria orgânica (APHA, 2021), teor de carbono orgânico total e nitrogênio total extraíveis no TOC e teor de ferro, alumínio e fósforo.

Figura 58. Amostras de sedimento coletadas no Brasil e Paraguai



Os resultados para a caracterização dos sedimentos de rios coletados tanto para o Brasil como para o Paraguai estão disponíveis no NITdocs. Para as amostras coletadas no lado brasileiro, foram observados teores de matéria orgânica variando entre 4,8 e 9,4% e baixas quantias de partículas finas (inferior a 32%). Já para as amostras paraguaias, os teores de matéria orgânica variaram entre 2,4 e 11,6%. A análise do teor de matéria orgânica também é uma variável importante nos estudos de avaliação da presença de pesticidas porque as substâncias húmicas podem competir pela adsorção em óxidos metálicos, ao mesmo tempo em que servem de sítios para ligação com os poluentes.

As tendências esperadas para os valores de pH nestas amostras se confirmaram: de forma geral, menores valores de pH foram encontrados para aquelas amostras com maior teor de matéria orgânica e partículas

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 78 de 92

finas, ou seja, nos sedimentos coletados no lago paraguaio da represa.

Para os teores de ferro, alumínio e fósforo, uma maior homogeneidade das amostras brasileiras em relação as amostras paraguaias. De modo geral, observou-se também que os teores de ferro foram sempre superiores aos de alumínio para as amostras brasileiras. Já nas amostras paraguaias, apresentaram maior dispersão nos dados visto que há uma grande variabilidade de composição dos sedimentos.

Com relação aos teores de fósforo total, os sedimentos de ambos os lados da represa apresentaram, em geral, valores próximos. Para o método A, foram encontradas, em média, 148 e 110 mg kg⁻¹ para as amostras do Brasil e Paraguai, respectivamente. Para o método B, os valores médios foram de 97 e 55 mg kg⁻¹.

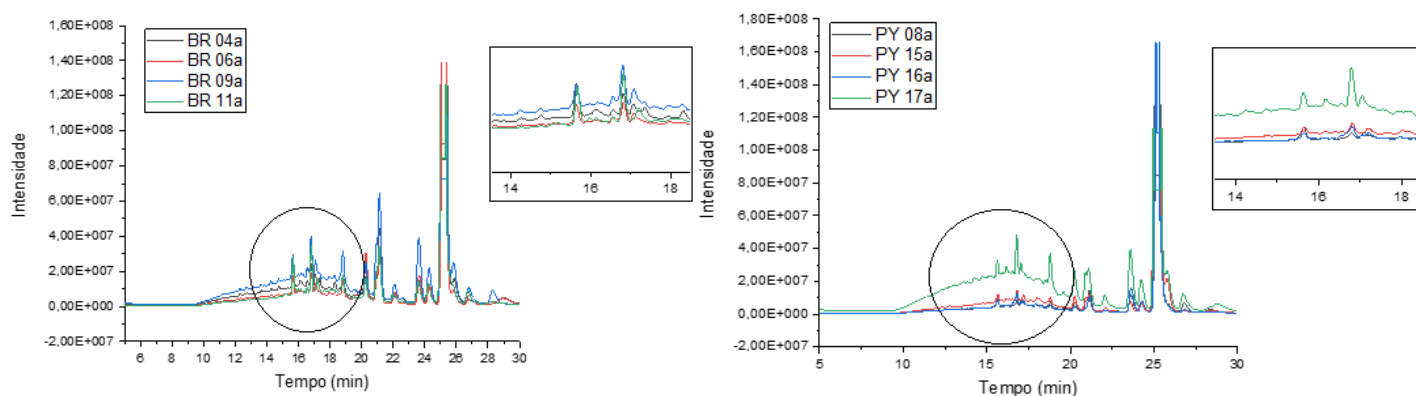
4.3.3.2 Método cromatográfico e de extração para determinação de Gly e AMPA

A análise das amostras ocorreu com a derivatização utilizando FMOC-Cl e a determinação ocorreu com o cromatógrafo em fase líquida com detector de fluorescência, seguindo o método cromatográfico desenvolvido. Diversos testes foram desenvolvidos para definição de melhor metodologia para extração de glifosato e AMPA das amostras de sedimento. A método de extração final está disponível no NITdocs.

4.3.3.3 Resultados da determinação de Gly e AMPA nos sedimentos

Apesar do método desenvolvido ter sido aplicado com sucesso na quantificação de glifosato e AMPA em amostras de sedimento, avaliando o sinal analítico do cromatograma da Figura 59 fica evidente a complexidade dessa análise, quer seja pelo próprio sinal dos compostos, quer seja pela matriz de sedimento. A maior diferença entre os cromatogramas é a deriva da linha base aproximadamente nos tempos de 10 a 20 min. As amostras com maior deriva são BR09a e PY17a. Comparando as amostras dentro do lado brasileiro a BR09a apresenta maior porcentagem de matéria orgânica analisada na primeira campanha. Em comparação com as amostras paraguaias, a PY17a que apresenta maior deriva, mas não possui grande discrepância dos valores de porcentagem de matéria orgânica, obtendo menor porcentagem do que PY15a e PY16a.

Figura 59. Cromatogramas completos como exemplo de perfil das amostras sem acréscimo de GLY e AMPA, branco das amostras do lado brasileiro e paraguaio



Os valores de glifosato e AMPA obtidos em cada campanha são mostrados na Figura 60. Para cada amostra,

Relatório de Cumprimento do Objeto

uma curva analítica foi construída e, por esse motivo, pode-se observar que o limite de quantificação (LOQ) de cada campanha é diferente para ambos os analitos. Embora tais compostos não foram detectados nas amostras de água, eles foram quantificados com sucesso nas amostras de sedimento, o que indica a dinâmica desses compostos é interagiram com o sedimento.

Figura 60. Resultados obtidos das três campanhas de coleta de sedimentos do Brasil e Paraguai para Glifosato e AMPA em $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os traços em azul e amarelo representam os limites de quantificação calculados para cada amostra analisada pelo método de adição de padrão.



Alguns pontos apresentaram elevadas [concentrações de LOQ](#), Gly e AMPA não puderam ser detectados ou estavam abaixo do limite. Curvas de adição de padrão dependem da concentração já existente na amostra e, provavelmente, nos casos de concentração muito elevada, é mais difícil estabelecer uma curva analítica. Este é o caso, por exemplo, do MPY16a, o qual apresentou na coleta de julho/2019 um LOQ de $135603,53 \mu\text{g kg}^{-1}$. Como não existe uma legislação para determinar a quantidade máxima de Gly e AMPA em sedimentos, só é possível avaliar e comparar os dados obtidos. Na maior parte das amostras, Gly foi encontrado em concentrações superiores a AMPA com concentrações entre $11,47$ e $1279,64 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Gly no Brasil e $15,05$ e $858,21$ de Gly $\mu\text{g kg}^{-1}$ no Paraguai, enquanto AMPA, $11,41$ e $407,73 \mu\text{g kg}^{-1}$ no Brasil e $11,22$ e $279,64 \mu\text{g kg}^{-1}$ no Paraguai. Gly foi detectado em 67 e 72% e AMPA em 61 e 64% das amostras analisadas no BR e PY,

Relatório de Cumprimento do Objeto

respectivamente.

4.3.3.4 Análises multivariadas – Parâmetros de qualidade do sedimento de teores de glifosato e AMPA (campanhas 1, 2 e 3)

A avaliação dos dados obtidos para Brasil e Paraguai foi realizada em conjunto, visando verificar semelhanças e diferenças entre as amostras. Todos os dados apresentados nas tabelas finais, construídas para Brasil e Paraguai, sendo a identificação de cada variável apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Variáveis empregadas na PCA realizada com os dados de qualidade de sedimento e teores de glifosato e AMPA (campanhas 1, 2 e 3)

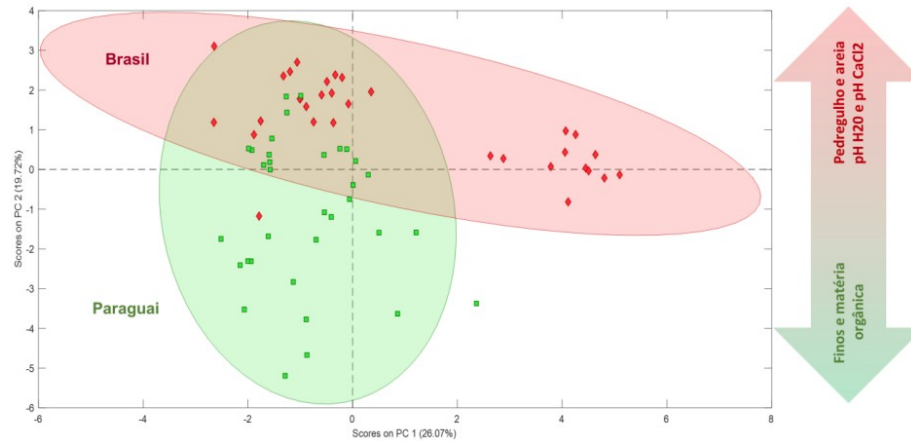
Tipo de análise	Variável	Identificação da variável na PCA
Análises físico-químicas	pH H ₂ O	1
	pH CaCl ₂	2
	Matéria Orgânica (%)	3
	Pedregulho (%)	4
	Areia (%)	5
	Finos (%)	6
Análises químicas	Carbono Orgânico Total (mg kg ⁻¹)	7
	Nitrogênio total (mg kg ⁻¹)	8
	Alumínio (Oxalato) (mg kg ⁻¹)	9
	Ferro (Oxalato) (mg kg ⁻¹)	10
	Fósforo (Oxalato) (mg kg ⁻¹)	11
	Alumínio (EPA)+B1 (mg kg ⁻¹)	12
	Ferro (EPA) (mg kg ⁻¹)	13
	Fósforo (EPA) (mg kg ⁻¹)	14
Determinação de Glifosato por HPLC-FLD	Concentração de glifosato (µg kg ⁻¹)	15
	Limite de detecção (µg kg ⁻¹)	16
	Limite de quantificação (µg kg ⁻¹)	17
Determinação de AMPA por HPLC-FLD	Concentração de AMPA (µg kg ⁻¹)	18
	Limite de detecção (µg kg ⁻¹)	19
	Limite de quantificação (µg kg ⁻¹)	20

Uma vez que os dados de Carbono Orgânico Total - TOC e de Nitrogênio Total - NT estavam indisponíveis para a maioria das amostras, essas variáveis foram desconsideradas nas melhores condições de análise, que foram alcançadas ao utilizar 3 componentes principais, com auto escalamento na matriz X. Os dados faltantes para as demais variáveis foram ainda substituídos usando a função “best guess”, a fim de evitar eliminação de mais variáveis e garantir a avaliação multivariada dos dados disponíveis.

Nestas condições foi possível explicar 62,29% da variância dos dados, bem como foi evidenciada uma clara distinção entre as amostras coletadas no Brasil (destacadas em vermelho) e as amostras do Paraguai (destacadas em verde), conforme o gráfico de scores apresentado na Figura 61.

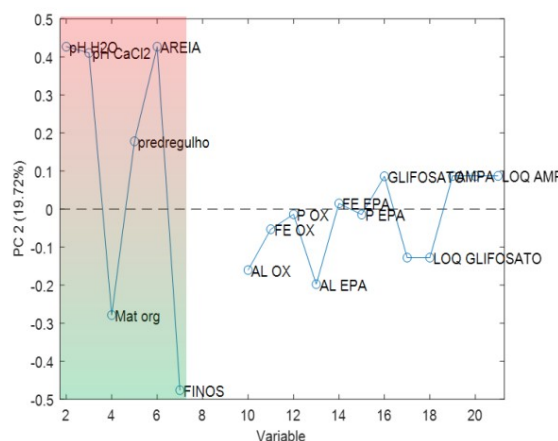
Relatório de Cumprimento do Objeto

Figura 61. Gráfico de scores da PC1x PC2 – Análise de Sedimentos. Destaque para o agrupamento de acordo com o tipo de solo e teores de pH



Avaliando-se o gráfico de scores é possível verificar que as amostras do Brasil se distribuem principalmente do lado positivo da PC2 enquanto as do Paraguai tendem a se agrupar mais ao lado negativo da PC1 e da PC2. Observado o gráfico de loadings da PC2 (Figura 6) é possível perceber que as principais variáveis responsáveis pela discriminação das amostras do BR/PY são o pH H₂O, pH CaCl₂ bem como as características de composição do sedimento, sendo evidente que as amostras coletadas no BR apresentaram maior influência das variáveis como teor de areia e pedregulhos (destacado em tons vermelhos nas Figuras 61 e 62), contra maior influência dos teores de finos e matéria orgânica nas amostras do Paraguai (destacado em tons verdes nas Figuras 61 e 62).

Figura 62. Gráfico de loadings da PC2 – Análise de sedimentos

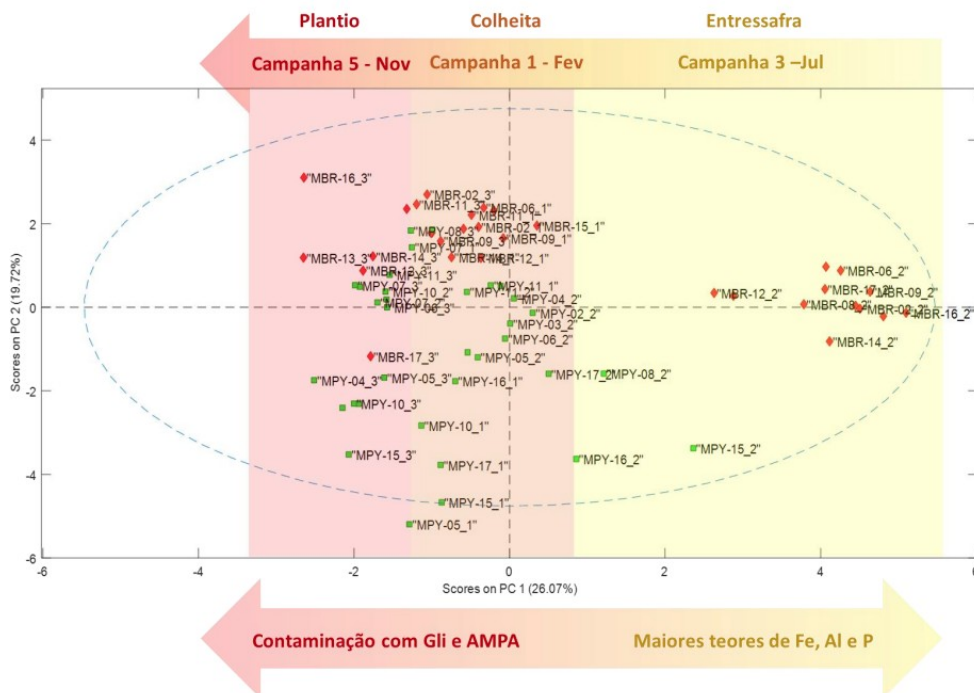


A presença de areia e pedregulho nos solos da região da fronteira entre o Brasil e o Paraguai está relacionada às características geológicas da região, que influenciam o material de origem dos solos e, conseqüentemente, sua composição granulométrica. Esta região da transfronteiriça da Bacia Hidrográfica do Paraná 3 (BP3) é composta, em grande parte, por rochas e sedimentos de origem basáltica (formação Serra Geral) e arenítica (formação Caiuá), sendo esta última comumente presente na região norte da BP3, que podem ter se

Relatório de Cumprimento do Objeto

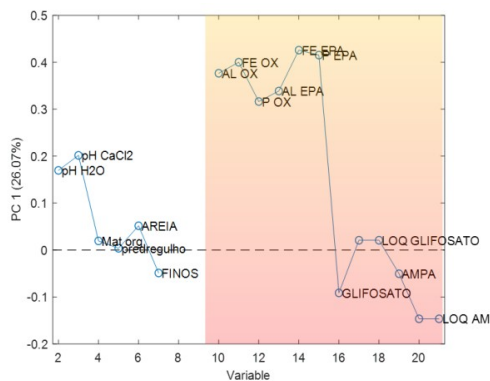
depositado como resultado de processos geológicos como erosão e sedimentação (Rocha e Bade, 2018). Avaliando-se mais detalhadamente a distribuição das amostras do gráfico de scores da PC1xPC2 (Figura 63) é possível verificar um agrupamento entre as amostras do Brasil e do Paraguai de acordo com a época da campanha. Apesar das diferenças nas propriedades físico-químicas observadas nos sedimentos, a proximidade das regiões de amostragem torna os regimes agrícolas dos dois países bastante semelhantes, o que pode justificar a distribuição semelhante das amostras em relação a PC1.

Figura 63. Gráfico de scores da PC1xPC2 – Análise de sedimentos. Destaques para a evidência de agrupamento de acordo com a época de campanha



De acordo com os loadings da PC1 (Figura 64) é possível evidenciar maior influência dos teores de Fe, Al e P do lado positivo (evidenciado em tom amarelos nas Figuras 63 e 64), e do teor de glifosato e AMPA do lado negativo (evidenciado em tom vermelhos nas Figuras 63 e 64).

Figura 64. Gráfico de loadings da PC1 – Análise de sedimentos



Relatório de Cumprimento do Objeto

Considerando o calendário agrícola do estado do Paraná (Figura 14) é possível verificar que a campanha 1 (fevereiro de 2019) foi realizada em período típico de colheita de milho e soja, o que justifica os valores intermediários de nutrientes encontrados nestas amostras e, conseqüentemente, a posição destas em relação a PC1.

Analisando a campanha 2 (julho de 2019) que foi realizada em época de entressafra, em que a adubação do solo é uma prática agrícola comumente realizada, a fim de manter ou ainda aumentar a fertilidade do solo para a safra subsequente. Isso justifica os maiores teores de nutrientes como fósforo, um dos principais componentes em fertilizantes, observados nessas amostras tanto no Brasil quanto no Paraguai e, assim, a distribuição das amostras localizada mais ao lado positivo da PC1 no gráfico de scores (Figura 63). Os sulfatos de ferro e alumínio são frequentemente empregados para suprir a deficiência de desses elementos para as plantas, bem como atuam na correção do pH do solo. Neste sentido, os compostos aplicados no preparo do solo para plantio podem ser carregados ao leito dos rios por escoamento superficial, o que pode justificar o aumento desses teores em sedimentos na época típica de adubação do solo. O mês de julho também é um período de inverno na região, em que as chuvas são menos recorrentes, o que pode minimizar a diluição dos contaminantes na água e contribuir para sua acumulação nos sedimentos.

Vale destacar ainda que menores teores desses nutrientes tendem a ser observados na época da colheita devido a absorção pelas plantas e menor disponibilidade de carreamento para demais compartimentos ambientais, minimizando assim a contaminação dos sedimentos. Isso pode ser observado para as amostras da campanha 1 (fevereiro de 2019) e ajuda a explicar a tendência observada na discriminação das amostras mais à esquerda da PC1 no gráfico de scores (Figura 63).

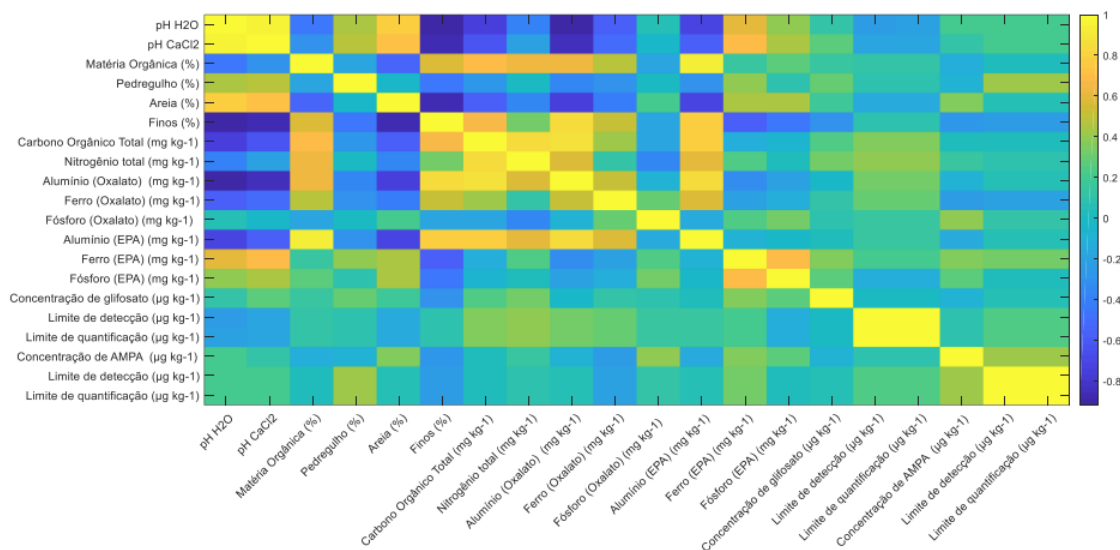
A campanha 3 (novembro de 2019) foi realizada em período de plantio de milho e soja, em que a aplicação de glifosato é comumente realizada para o controle da vegetação existente e preparar o solo para o plantio de culturas como milho e soja. Assim, os maiores teores de glifosato foram observados nesta campanha, tanto no Brasil quanto no Paraguai. Na época de plantio os nutrientes tendem a serem absorvidos com o crescimento das mudas, de maneira que, além dos maiores valores de glifosato e AMPA, baixos teores de nutrientes são observados para estas amostras, o que pode contribuir para valores de scores da PC1 mais negativos para estas amostras.

A partir destes resultados é possível concluir que a análise físico-química dos sedimentos e dos teores de glifosato e AMPA nas amostras tem grande potencial para a obtenção de uma ferramenta viável para a identificação de fontes de poluição decorrentes das atividades agrícolas comuns à região, sendo possível verificar relação evidente entre os parâmetros avaliados e os períodos de plantio, colheita e entressafra da região.

Visando verificar correlação entre as variáveis, especialmente evidenciar os fatores que influenciam os teores de glifosato e AMPA nas amostras, foi gerada a matriz de correlação linear de Person, também em ambiente MATLAB, considerando todas as variáveis empregadas na PCA, sendo avaliados conjuntamente os dados do Brasil e do Paraguai. A matriz foi construída ignorando-se os valores faltantes (análises não realizadas) e o heatmap obtido pode ser observado na Figura 65.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Figura 65. Heatmap da matriz de correlação linear de Pearson obtido para os dados globais de sedimentos do Brasil e do Paraguai



É possível verificar uma interação fortemente positiva entre os teores de matéria orgânica e os Teores de Carbono Orgânico e Nitrogênio Totais, conforme esperado, há uma correlação positiva entre a matéria orgânica e a distribuição de particulados finos, uma vez que estes podem ter origem na decomposição da matéria orgânica e, conseqüentemente, na geração de partículas menores. Ambas as variáveis se correlacionam positivamente com os teores de ferro (oxalato) e alumínio (oxalato), o que é esperado uma vez que o oxalato de ferro e alumínio são formados a partir da interação entre íons de ferro e alumínio com ácidos orgânicos presentes na matéria orgânica em suspensão no rio.

Devido às características distintas dos sedimentos do Brasil e do Paraguai foi realizada uma avaliação isolada dos coeficientes de correlação linear para cada país, a fim de evidenciar a influência das principais variáveis identificadas na PCA nos teores de glifosato e AMPA observados nas amostras. Visando enfatizar a influência destas variáveis, a matriz de correlação foi construída utilizando os dados da campanha 3 (novembro de 2019), em que foram observados os maiores teores de glifosato e AMPA, o que pode permitir evidenciar diferenças sutis e importantes nas características dos sedimentos, que podem ter sido suprimidas na análise global devido às grandes discrepâncias entre as amostras do BR e do PY. Os heatmaps das matrizes de correlação linear obtidos para cada país estão apresentados na Figura 66.

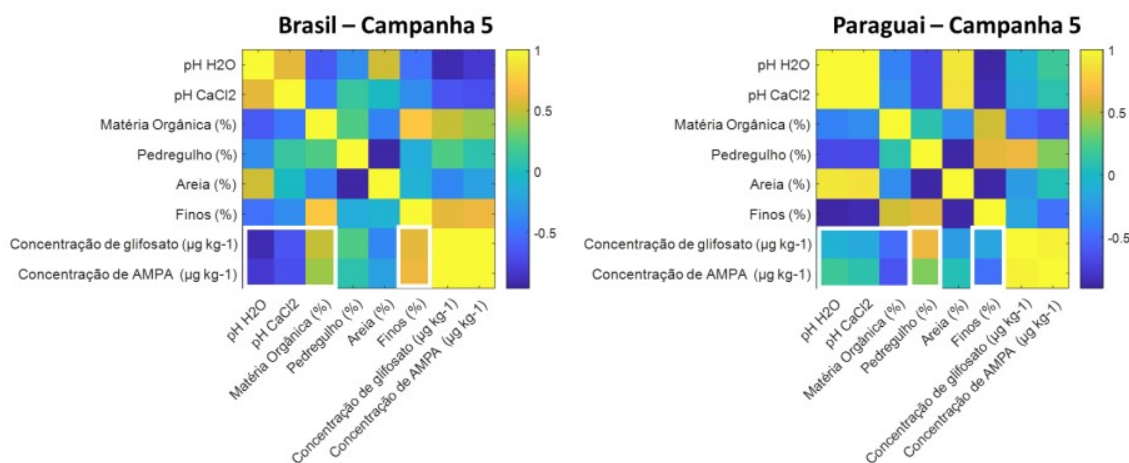
Considerando a heatmap obtido para o Brasil, é possível verificar uma correlação fortemente negativa entre os valores de pH e os teores de glifosato e AMPA nas amostras, bem como uma correlação fortemente positiva com o aumento da matéria orgânica nestas amostras, o que permite maior retenção/adsorção dos contaminantes nas amostras.

Figura 66. Heatmap da matriz de correlação linear de Pearson obtido para os dados de sedimentos da

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 85 de 92

campanha 3 do Brasil e Paraguai, isoladamente



Em sedimentos mais ácidos e com maiores teores de matéria orgânica e particulados finos, como as amostras coletadas no Paraguai, a retenção de glifosato e AMPA é altamente favorecida, o que já é conhecido na literatura (GUNARATHNA et al., 2018). Contudo, ao olhar atentamente para o heatmap da matriz de correlação obtida para os dados do Paraguai (campanha 3), é possível verificar uma inversão na relação dos teores de contaminantes em comparação com o observado para o Brasil, ou seja, correlação positiva com pH e negativa com a matéria orgânica e particulados finos (destacado pelo contorno em branco nos respectivos heatmaps). Devido à alta capacidade de retenção destes sedimentos, fatores que favoreçam a dessorção podem eventualmente facilitar o processo de extração para posterior determinação quantitativa dos analitos, o que pode explicar esta inversão nas correlações. A correlação mais positiva com os teores de areia e pedregulho nestas amostras também corrobora para esta hipótese. Esse efeito acaba sendo suprimido ao avaliar os dados dos dois países em conjunto, não sendo identificado a partir dos dados da matriz global (Figura 65), cujas correlações se assemelham mais com as obtidas para as amostras do Brasil.

Pode-se concluir que a natureza dos sedimentos pode ter influência sobre as respostas obtidas para glifosato e AMPA pelo procedimento de extração, já que as propriedades do sedimento e as condições ambientais influenciam fortemente a persistência desses compostos, ressaltando-se a importância de uma adequada verificação de potenciais efeitos de matriz na determinação dos analitos neste tipo de amostra, por meio de ensaios de adição e recuperação, a fim de assegurar a exatidão do método de extração proposto nos diferentes pontos de amostragem avaliados. Caso a determinação por adição de padrão tenha sido realizada apenas nos extratos, e não fortificando as amostras antes da extração para que todo o processo de extração e quantificação tenha sido validado, recomenda-se a avaliação da exatidão nas diferentes amostras ou em pools de amostra em eventuais campanhas futuras. E, apesar de alguns locais não ter aplicação direta dos pesticidas nos locais de amostragens, a presença dos compostos nos sedimentos, independente de qual grupo de amostragem, demonstra que além de lixiviados para rios entorno das atividades agrícolas eles se adsorvem ao sedimento e se acumulam mesmo em ambientes pouco impactados diretamente pela agricultura.

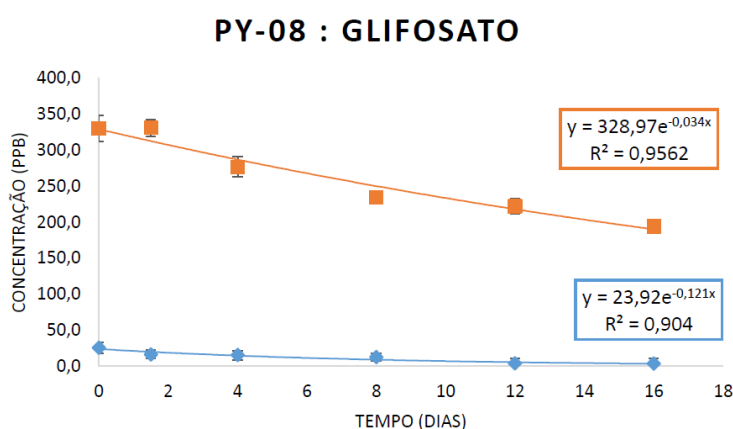
4.3.3.5 Tempo de meia-vida do glifosato

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 86 de 92

Para completar o estudo, realizou-se o levantamento bibliográfico do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do glifosato no ambiente. Assim como já salientado, as propriedades do solo e as condições ambientais influenciam fortemente a persistência de glifosato e AMPA no meio ambiente e não existe estudo prévio de tal avaliação em sedimentos coletados na região. Dessa forma, amostras da primeira coleta com diferentes características de matéria orgânica, pH e metais foram selecionadas. O arranjo experimental empregado para avaliação do tempo de meia-vida pode ser consultado no NITdocs.

Figura 67. Tempo de meia-vida do Glifosato para PY08. A linha em cor laranja corresponde ao sistema dopado e a em azul é referente ao sistema controle



Apesar do glifosato ser considerado não persistente no meio ambiente, os valores de $t_{1/2}$ encontrados neste trabalho são considerados altos em comparação com valores da literatura o que pode indicar um acúmulo do glifosato no meio ambiente, além de comprovar a maior persistência do seu principal metabólito, o AMPA, que possui toxicidade mais elevada (GALLI e MONTEZUMA, 2005; LUPI et al., 2015, 2019). A falta de um número amostral maior dificultou o tratamento estatístico dos fatores estudados em relação ao valor de tempo de meia vida, porém comprovou os indícios das relações da degradação dos compostos no ambiente com os parâmetros escolhidos.

5. Publicações e divulgação

5.1 Artigos Publicados

[Meta 2] BECKER, R. W.; ARAÚJO, D. S.; SIRTORI, C.; TOYAMA, N. P.; TAVARES, D. A.; CORDEIRO, G. A.; BENASSI, S. F.; GOSSEN, A. C.; AMARAL, B. Pesticides in surface water from Brazil and Paraguay cross-border region: screening using LC-QTOF MS and correlation with land use and occupation through multivariate analysis. *Microchemical Journal*, 2021

[Meta 3] OUCHI-MELO, L. S.; AMARAL, B.; TAVARES, D. A.; BARTOZEK, E. C.R.; SOUZA, J. E.; PEREIRA, L. H.G.; AURICCHIO, M.R.; SILVA, M. X.; TOYAMA, N. P.; NUNES, P. H.; LAMBRECHT, R. W.; PERES, C. K. Brazilian vs. Paraguayan streams: Differences in water quality in a cross-border subtropical region. *LIMNOLOGICA*, 2021.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 87 de 92

[Meta 3] BARTOZEK, E.C. R.; LAMBRECHT, R W.; ZORZAL-ALMEIDA, S.; AURICCHIO, M. R.; PERES, C. K. Stream morphology, water dynamics, and agrochemicals are important drivers of periphyton biomass in subtropical streams. *Hydrobiologia*, 2022

[Meta 4] MATIAS, T. P.; BRAGA, J. K.; DAMASCENO, L. H. S.; BRUCHA, G. Aspectos envolvidos na biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução. *Research, Society and Development*, 2021.

5.2 Artigos em fase de publicação:

[Meta 2] Sensitive LC-FLD determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in surface water from the Paraná river basin.

[Meta 4] Fungal community dynamics in agriculture soil with continuous use of the pesticide atrazine

[Meta 4] Structural Responses and Adaptation of Fungal Communities to Atrazine

[Meta 4] Anaerobic degradation of 2,4-D in an horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor (HAIB) inoculated with enriched sediment from the Itaipu reservoir-Paraná-Brazil

5.3 Resumos publicados em anais de congressos

[Meta 2] BECKER, R. W.; ARAÚJO, D. S.; DALLEGRAVE, A.; AMARAL, B.; TOYAMA, N. P.; CORDEIRO, G. A.; SIRTORI, C. Wide scope screening of pesticides in superficial water by UHPLC-QTOF MS. XIV Simposio Latino-Americano de Química Analítica Ambiental, 2019.

[Meta 2] TOYAMA, N. P. PLETSCH, A. L.; BOROSKI, M.; AMARAL, B.; WATANABE, A. L. Development of a miniaturized methodology for quantification of DHA in pacu (*piaractus mesopotamicus*). 20º Encontro Nacional de Química Analítica e 8º Congresso Ibero-Americano De Química Analítica, 2022.

[Meta 2] JACUMAZO, J.; TAVARES, D. A.; TOYAMA, N. P.; AMARAL, B. Development and validation of a method for the determination of total nitrogen in environmental samples by ion chromatography. 20º Encontro Nacional de Química Analítica e 8º Congresso Ibero-Americano De Química Analítica, 2022.

[Meta 2] GABARDO, R. P.; AMARAL, B.; CORDEIRO, G. A.; PERALTA-ZAMORA, P. Sensitive determination of triazine pesticides in surface water by DLLME-LC-MS. 20º Encontro Nacional de Química Analítica e 8º Congresso Ibero-Americano De Química Analítica, 2022.

[Meta 2] AMARAL, B.; TOYAMA, N. P.; TAVARES, D. A.; CORDEIRO, G. A.; GARAY, L. I.; BENEGAS, G. S.; SOUZA, J. E. Atrazine and metabolites monitoring in Brazil and Paraguay streams by GC-MS. 20º Encontro Nacional de Química Analítica e 8º Congresso Ibero-Americano De Química Analítica, 2022.

[Meta 4] MOREIRA, J.V.F.; CHIBA DE CASTRO, W.A.; SANTOS, R. C. B. Effect of atrazine on fungal communities in agricultural soil from Paraná basin 3, Brazil, CBM. 2019. (Meta 4)

[Meta 4] LOBO, G. V.; BRUCHA, G. Study of anaerobic biodegradation of herbicide 2,4-D under different redox conditions. 18th International Society for Microbial Ecology. 2022 (Meta 4)

5.4 Formação e aperfeiçoamento profissional

[Meta 2] RENATA PRUSSAK GABARDO. Estabelecimento de métodos de extração para determinação de

Relatório de Cumprimento do Objeto

herbicidas e produtos de degradação em águas naturais. 2023. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná. Orientador: Patricio Peralta-Zamora.

[Meta 3] RODRIGO CROVELLA SIMÕES. Efeitos da paisagem ("Landscape" e "Riverscape") na estrutura de comunidades de macroalgas de riachos subtropicais. 2019. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Neotropical) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Orientador: Cleto Kaveski Peres.

[Meta 3] MARINA RAMOS AURICCHIO. Levantamento florístico de macroalgas do leste do Paraguai. 2022. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Neotropical) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Orientador: Cleto Kaveski Peres.

[Meta 3] LILIAM DA SILVA VEIGA PEIXOTO. Efeitos de micropoluentes em fígado de peixes coletados em riachos de bacias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional (Brasil e Paraguai). 2020. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Neotropical) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Orientador: Pablo Henrique Nunes.

[Meta 3] VILMARA DE OLIVEIRA. Diversidade e Estrutura Genéticas de *Bryconamericus* aff. *Iheringii* (Characiformes: Characidae) na Área de Influência do Reservatório da Itaipu. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Biologia). Orientador: Luiz Henrique Garcia Pereira

[Meta 4] GESSYCA FERNANDA DA SILVA. Avaliação da diversidade genética e funcional de fungos filamentosos em solo com atrazina. 2018. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Neotropical) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Orientador: Rafaella Costa Bonugli Santos.

[Meta 4] GIULIO MENDES BRAATZ. Identificação taxonômica de fungos isolados de um sistema de microcosmos contaminados com atrazina. 2019. Iniciação Científica. (Graduando em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Orientador: Rafaella Costa Bonugli Santos. (Meta 4)

[Meta 4] JOÃO VICTOR FONSECA MOREIRA. Isolamento de Fungos em Microcosmos com Solo Contaminado com Atrazina. 2018. Iniciação Científica. (Graduando em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Orientador: Rafaella Costa Bonugli Santos.

[Meta 4] JOSÉ ALEJANDRO MORALES GÓMEZ. Descrição da diversidade genética e funcional de fungos em solo com atrazina por métodos independentes de cultivo. 2019. Bolsa técnica. Orientador: Rafaella Costa Bonugli Santos.

[Meta 4] TALIS PEREIRA MATIAS. Biodegradação anaeróbia da atrazina em diferentes condições de oxirredução. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas. Orientador: Gunther Brucha.

-Outros bolsistas do convênio podem ser consultados no NITdocs nas páginas de relatórios dos bolsistas de cada meta.

Referências Bibliográficas

ADAPAR. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Relatório SIAGRO. 2022

ANDOGNINI, J. Tudo a respeito do novo herbicida terbutilazina. 2021. Disponível em <<https://blog.aegro.com.br/terbutilazina/>>

Relatório de Cumprimento do Objeto

ANSES. S-metolachlor: moving towards a ban on the main uses to preserve groundwater quality. Disponível em <<https://www.anses.fr/en/content/s-metolachlor-preserve-groundwater-quality>>

AGGELOPOULOS, C. A., TATARAKI, D.; RASSIAS, G. Degradation of atrazine in soil by dielectric barrier discharge plasma - potential singlet oxygen mediation. Chemical Engineering Journal, 682-694, 2018.

BATTARBEE, R. W., S. T. PATRICK, B. WATHNE, R. PSENNER & R. MOSELLO. Measuring and modelling the dynamic response of remote mountain lake ecosystems to environmental change (the MOLAR project). Verh. Internat. Verein. Limnol., 27, 3774-3779. 2001.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases, n. 22, p. 22-34, 1999.

BROCH, D. L.; RANNO, S. K. Fertilidade do solo, adubação e nutrição da cultura da soja. Fundação MS, 2008.

BROCK, T. C. M.; LAHR, J.; VAN DEN BRINK, P. J. Insecticides: ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems. Wageningen: Alterra, 2000.

CASTRO BERMAN, M. et al. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. Chemosphere, v. 200, p. 513-522, 2018.

CETESB. Apêndice E. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. 2019. Disponível em <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios>>

CETESB. Diagnostico da Contaminação de Águas Superficiais Subterrâneas e Sedimentos por Agrotóxicos. 2021. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2021/10/Diagnostico-da-Contaminacao-de-Aguas-Superficiais-Subterraneas-e-Sedimentos-por-Agrotoxicos_.pdf>

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C.; HERNANI, L. C. Fertilidade de solos. Nutrição e Adubação do Milho. Embrapa Milho e Sorgo. EMBRAPA, 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. CALENDÁRIO AGRÍCOLA (PLANTIO E COLHEITA) do ano de 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/institucional/publicacoes/outras-publicacoes/item/7694-calendario-agricola-plantio-e-colheita>.

DELLA-FLORA, A.; WIELENS BECKER, R.; FREDERIGI BENASSI, S.; THEODORO TOCI, A.; CORDEIRO, G.A.; IBÁÑEZ, M.; PORTOLÉS, T.; HERNÁNDEZ, F.; BOROSKI, M.; SIRTORI, C. Comprehensive investigation of pesticides in Brazilian surface water by high resolution mass spectrometry screening and gas chromatography-mass spectrometry quantitative analysis. Science of the Total Environment, v. 669, p. 248-257, 2019.

DELLA-FLORA, A. et al. Fast, cheap and easy routine quantification method for atrazine and its transformation products in water matrixes using a DLLME-GC/MS method. Analytical Methods, v. 10, n. 45, p. 5447-5452, 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The International Code of Conduct on Pesticide Management. 2023. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>

FREITAS, J. Chegada da Terbutilazina ao Brasil marca uma nova era no controle de plantas daninhas, inicialmente no milho. 2021. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/chegada-da-terbutilazina-ao-brasil-marca-uma-nova-era-no-controle-de-plantas-daninhas-inicialmente-no-milho/>>

GALLI, Antonio J. B.; MONTEZUMA, Marcelo C. Glifosato: Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Editora ACADCOM, 2005.

Relatório de Cumprimento do Objeto

GARCÍA-PALACIOS, Pablo et al. Temporal dynamics of biotic and abiotic drivers of litter decomposition. *Ecology letters*, v. 19, n. 5, p. 554-563, 2016.

GUNARATHNA, S.; GUNAWARDANA, B.; JAYAWEERA, M.; MANATUNGE, J.; ZOYSA, K. Glyphosate and AMPA of agricultural soil, surface water, groundwater and sediments in areas prevalent with chronic kidney disease of unknown etiology, Sri Lanka. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53(11), 729–737, 2018.

HOOPER, L.; HUBBART, J.A. A Rapid Physical Habitat Assessment of Wadeable Streams for Mixed-Land-Use Watersheds. *Hydrology* 2016, 3, 37. <https://doi.org/10.3390/hydrology3040037>

KARAM, D.; LARA, F. R.; CRUZ, M. B.; PEREIRA FILHO, I. A.; PEREIRA, F. T. F. Características do herbicida S-metolachlor nas culturas de milho e sorgo. *Circular Técnica Embrapa*. 2003.

KAUFMANN, P. R., P. LEVINE, E. G. ROBISON, C. SEELIGER, AND D. V. PECK. Quantifying physical habitat in wadeable streams. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/620/R-99/003, Washington, D.C. Disponível em: http://www.epa.gov/emap/html/pubs/docs/groupdocs/surfwatr/field/ws_abs.html. 1999.

LEFCHECK, J. S. piecewiseSEM: piecewise structural equation modelling in R for ecology, evolution, and systematics. *Methods in Ecology & Evolution*, v. 7, n. 5, p. 573-579, 2016.

LEWIS, K.A., TZILIVAKIS, J., WARNER, D.J., GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 22, 1050-1064; 2016.

LIN, C. H.; LERCH, R. N.; GARRETT, H. E.; GEORGE, M. F. Bioremediation of Atrazine-Contaminated Soil by Forage Grasses: Transformation, Uptake, and Detoxification. *Technical reports: Bioremediation & Biodegradation*, v. 37, 196-206, 2008.

LUPI, L. et al. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment*, v. 536, p. 687–694, 2015.

LUPI, L. et al. Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere*, v. 225, p. 906–914, 2019.

MEAKY, M. E., OKECHUKWU, S.H. Biostimulatory Effect of Cassava Peel Waste on the Indigenous Fungi in Atrazine-impacted Soil. *Journal of Advances in Microbiology*, 9(2), 1-11, 2018.

MEDLIN, L. & KACZMARSKA, I. Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision, *Phycologia*, 43:3, 245-270, 2004

NGUYEN, N. H.; SONG, Z.; BATES, S. T.; BRANCO, S.; TEDERSOO, L.; MENKE, J.; SCHILLING, J. S.; KENNEDY, P. G. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241-248, 2016.

ODUM, E. P.; BARRET, G. W. Fatores limitantes e regulatórios. Em: *Fundamentos de Ecologia*. São Paulo: Cengage Learning, 177-233, 2011.

OLADELE, S.; AYODELE, O., Glyphosate, 1,1'- dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride and Glyphosate, 1,1'- dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride and fungal communities in a tropical alfisol. *Eurasian J Soil Sci*, 6, 238-248, 2017.

PANIS, C., CANDIOTTO, L.Z.P., GABOARDI, S.C., GURZENDA, S., CRUZ, J., CASTRO, M., LEMOS, B. Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. *Environmental International*. 165, 107321, 2022.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; R CORE TEAM. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-162, 2020. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.

Relatório de Cumprimento do Objeto

PIRES, N. L. et al. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection in waters of the Santarém Plateau, Brazilian Amazon. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 55, n. 9, p. 794–802, 2020.

PLOFFER, L. D. The Diaporthe/Phomopsis disease complex of soybean. Em: *World Soybean Research Conference*. Buenos Aires: s.n., 1695-1697, 1989.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 15 ago. 2019.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20, 1985.

REMBISCHEVSKI, P.; PAUMGARTTEN, F. J. R. On the excess of cancer cases attributable to drinking water contamination by pesticides in Brazil (Comment on Panis et al. 2022. Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. *Environ. Int.* 165: 107321), *Environment International*, v.169, 2022.

ROCHA, A. S., BADE, R. F. Geografia da bacia hidrográfica do Paraná 3: fragilidades e potencialidades socioambientais / Jundiaí, SP: Ed. In House, 314, 2018.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G. The diatoms. *Biology & morphology of the genera*. New York: Cambridge University Press. 1990, p. 1-129.

SAWYER, J. Surface Waters: Ammonium is Not Ammonia – Part 1. *Integrated Crop Management News*. Disponível em <https://crops.extension.iastate.edu/cropnews/2008/04/surface-waters-ammonium-not-ammonia-%E2%80%93part-1>. Acessado em 19/06/2023.

SERESHTI, H. et al. Development of a sustainable dispersive liquid–liquid microextraction based on novel hydrophobic and hydrophilic natural deep eutectic solvents for the analysis of multiclass pesticides in water. *Microchemical Journal*, 175, n. January, 107226, 2022.

SHIPLEY, B. *Cause and Correlation in Biology: A User's Guide to Path Analysis, Structural Equations and Causal Inference*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

SILVA, D. F. et al. *Análise de Nitrato e Amônio em Solo e Água*. Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 55 p.

SIMONATO, J., GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. *Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja*. Tecnologia e Produção: Soja, 16, 2013.

SKOWRON, P. et al. Anthropogenic sources of potassium in surface water: The case study of the Bystrzyca river catchment, Poland. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 265, p. 454-460, 2018.

STEELE, M. K.; AITKENHEAD-PETERSON, J. A. Long-term sodium and chloride surface water exports from the Dallas/Fort Worth region. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 3021-3032, 2011.

TANKIEWICZ, W.; BIZIUK, M. Fast, sensitive and reliable multi-residue method for routine determination of 34 pesticides from various chemical groups in water samples by using dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410:1533-1550 (2018).

USEPA. Reregistration Eligibility Decision facts. Disponível em https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-108801_1-Apr-95.pdf

ZAK, D. et al. Sulphate in freshwater ecosystems: A review of sources, biogeochemical cycles, ecotoxicological effects and bioremediation. *Earth-Science Review*, v. 212, p. 103446, 2021.

Relatório de Cumprimento do Objeto

Página 92 de 92

ZEMOLIN, C.R.; AVILA L.A.; CASSOL, G.V.; MASSEY, J.H.; CAMARGO, E.R. Environmental fate of S-Metolachlor - A Review. Planta Daninha, v. 32, 655-664, 2014.

JUSTIFICATIVA DA NÃO EXECUÇÃO, SE FOR O CASO:

Foz do Iguaçu, 25 de julho de 2023.

Profª. Drª. Gilcélia A Cordeiro

Gestora do Projeto – UNILA



Emitido em 24/08/2023

PRESTAÇÃO DE CONTAS Nº 2/2023 - DAILACVN (10.01.06.03.04.01)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 24/08/2023 12:33)

GILCELIA APARECIDA CORDEIRO

PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR

SACT (10.01.05.25)

Matrícula: ###518#9

Visualize o documento original em <https://sig.unila.edu.br/documentos/> informando seu número: **2**, ano: **2023**, tipo:
PRESTAÇÃO DE CONTAS, data de emissão: **24/08/2023** e o código de verificação: **75973afdbe**