

INSTRUMENTO PARTICULAR DE CONVÊNIO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA E FINANCEIRA PARA DESENVOLVIMENTO DO PROJETO EFEITO DE MICROPOLUENTES NA BIODIVERSIDADE DE RIACHOS DAS MICROBASIAS DO ENTORNO DO RESERVATÓRIO DE ITAIPU - REGIÃO TRANSFRONTEIRIÇA (BR - PY). FASE 2: ESTABELECENDO PROTOCOLOS DE BIOMONITORAMENTO POR MEIO DA INTEGRAÇÃO DE DIFERENTES NÍVEIS DA BIODIVERSIDADE (GENÉTICO E COMUNIDADES) E MÉTODOS DE ESTUDOS (CLÁSSICOS E MOLECULARES), QUE ENTRE SI CELEBRAM ITAIPU E FUNDAÇÃO PARQUE TECNOLÓGICO ITAIPU E UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA.

ITAIPU, entidade binacional, constituída nos termos do Artigo III do Tratado firmado entre a República Federativa do Brasil e a República do Paraguai, em 26 de abril de 1973, com sedes em Brasília-DF, Brasil, Setor Comercial Norte (SCN), Quadra 4, Bloco B, Edifício Centro Empresarial Varig - Sala 101, CEP 70.714-900 Brasília, Distrito Federal, e em Assunção, Paraguai, Avenida España, nº 850, inscrita no Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica (CNPJ) sob nº 00.395.988/0001-35, com escritório em Foz do Iguaçu - PR, na Av. Silvio Américo Sasdelli, nº 800, Vila A, sendo a Usina Hidrelétrica de Itaipu localizada na Avenida Tancredo Neves, nº 6731, Foz do Iguaçu - PR, neste ato representada por seu Diretor Financeiro Executivo e por seu Diretor Financeiro, que ao final assinam digitalmente;

e, na qualidade de CONVENIADA, **FUNDAÇÃO PARQUE TECNOLÓGICO ITAIPU - BRASIL - FPTI**, pessoa jurídica de direito privado, sem fins lucrativos, inscrita no CNPJ sob o nº 07.769.688/0001-18, com sede na cidade de Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, Av. Tancredo Neves, 6731, Cx. Postal 1511, CEP: 85867-9000, Parque Tecnológico Itaipu - PTI/ME, neste ato representada por seus Diretores, que ao final assinam digitalmente,

e a **UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA - UNILA**, pessoa jurídica de direito público, sem fins lucrativos, com sede na Avenida Silvio América Sasdelli, 1842, Vila A, Edifício Comercial Lorivo, CEP: 85866-000, na cidade de Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, inscrita no CNPJ sob o nº 11.806.275/0001-33, neste ato representada por seu Reitor, que ao final assina digitalmente;

resolvem, de comum acordo, celebrar o presente CONVÊNIO, em conformidade com as seguintes cláusulas e condições:

CAPÍTULO I

DO OBJETO DO CONVÊNIO

CLÁUSULA PRIMEIRA - O presente CONVÊNIO tem por finalidade a cooperação da ITAIPU e da CONVENIADA para desenvolvimento conjunto do projeto denominado “Efeito de micropoluentes na biodiversidade de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu - região transfronteiriça (BR - PY). Fase 2: Estabelecendo protocolos de biomonitoramento por meio da integração de diferentes níveis da biodiversidade (genético e comunidades) e métodos de estudos (clássicos e moleculares)”, de acordo com o Plano de Trabalho - Anexo I.

CAPÍTULO II

DOS DOCUMENTOS INTEGRANTES DO CONVÊNIO

CLÁUSULA SEGUNDA - Este CONVÊNIO rege-se pelas cláusulas nele contidas e pelo Plano de Trabalho - Anexo I - que, rubricado pelas partes, integra o presente instrumento.

Parágrafo único - Em caso de divergência entre o previsto neste CONVÊNIO e no seu anexo, prevalecerá sempre o estabelecido neste CONVÊNIO.

CAPÍTULO III

DA GESTÃO DO CONVÊNIO

CLÁUSULA TERCEIRA - Cada partícipe informará o nome e o cargo do gestor do presente CONVÊNIO, mediante correspondência formal enviada em até 10 (dez) dias úteis após a celebração do presente instrumento, os quais terão responsabilidades individuais, conjuntas e solidárias pela escorreita execução do CONVÊNIO.

Parágrafo primeiro - O gestores das CONVENIADAS deverão fiscalizar a implementação, execução e acompanhamento das atividades descritas no CONVÊNIO e respectivo Plano de Trabalho.

Parágrafo segundo - O gestor da ITAIPU será responsável pelo acompanhamento da execução do CONVÊNIO e a correta aplicação dos recursos, bem como pelas demais obrigações previstas nas normas internas da ITAIPU.

Parágrafo terceiro - Poderá haver, a qualquer tempo, substituição temporária ou definitiva do gestor de qualquer um dos partícipes, bastando a comunicação por escrito aos outros partícipes.

CAPÍTULO IV

DAS OBRIGAÇÕES DOS PARTÍCIPES

CLÁUSULA QUARTA - Compete à ITAIPU, por intermédio do seu gestor e seguindo os procedimentos vigentes na ITAIPU:

- a) executar as atividades sob sua responsabilidade de acordo com o Plano de Trabalho;
- b) fornecer as informações necessárias à realização das atividades objeto deste CONVÊNIO;

- c) promover o repasse dos recursos financeiros de acordo com o Cronograma de Desembolso do Anexo I, observadas as normas legais pertinentes;
- d) orientar, coordenar, supervisionar, fiscalizar e analisar a execução do CONVÊNIO;
- e) promover e coordenar reuniões periódicas com as CONVENIADAS;
- f) analisar os relatórios/medições apresentadas pelas CONVENIADAS sobre a execução do objeto do CONVÊNIO;
- g) analisar a Prestação de Contas referentes aos recursos alocados no CONVÊNIO;
- h) aprovar os procedimentos técnicos e operacionais necessários à execução do objeto deste CONVÊNIO; e
- i) manter registros, arquivos e controles contábeis específicos no local onde forem contabilizados os documentos originais fiscais ou equivalentes, comprobatórios das despesas realizadas com recursos do presente CONVÊNIO pelo prazo de 10 (dez) anos, contado da data da aprovação por ITAIPU da Prestação de Contas Final.

CLÁUSULA QUINTA - Compete às CONVENIADAS, por intermédio dos respectivos gestores:

- a) garantir os recursos materiais, humanos e financeiros indispensáveis à execução do CONVÊNIO, conforme definido no Plano de Trabalho;
- b) executar, direta ou indiretamente, as atividades necessárias à consecução do objeto a que alude este CONVÊNIO, observando os critérios de qualidade técnica, os prazos e os custos previstos no Plano de Trabalho;
- c) respeitar as normas aplicáveis na utilização de recursos financeiros da ITAIPU;
- d) prestar contas da totalidade dos gastos envolvendo os recursos financeiros da ITAIPU e a contrapartida das CONVENIADAS;
- e) responsabilizar-se pelos encargos de natureza trabalhista, previdenciária e tributária, bem como os de natureza securitária, de seu pessoal, próprio ou terceirizado que designar, ou por empresas que venha a contratar a qualquer título para exercer atividades relacionadas a este CONVÊNIO, não sendo transferida à ITAIPU nenhuma responsabilidade;
- f) responsabilizar-se por prejuízos causados por ela ou pelos seus prepostos a pessoas ou bens, na execução deste CONVÊNIO e resultantes de atos ou omissões dolosas ou culposas, tais como negligência, imprudência ou imperícia;
- g) refazer, sob sua exclusiva e integral responsabilidade, sem ônus para ITAIPU, as atividades realizadas em desacordo com o Plano de Trabalho;
- h) assegurar o acesso e a utilização, pela ITAIPU, dos resultados das atividades objeto deste CONVÊNIO;
- i) fornecer as informações necessárias à realização das atividades objeto deste CONVÊNIO;
- j) não utilizar os recursos recebidos da ITAIPU em finalidade diversa da estabelecida neste Instrumento, ainda que em caráter de emergência;
- k) propiciar, no local de realização do objeto, os meios e as condições necessárias para que a ITAIPU possa realizar supervisões;
- l) compatibilizar o objeto deste CONVÊNIO com as normas de preservação ambiental, quando for o caso;
- m) restituir à ITAIPU eventual saldo dos recursos financeiros repassados, inclusive aquele proveniente de rendimentos de aplicação financeira, em virtude da conclusão, denúncia, rescisão ou extinção do CONVÊNIO;
- n) manter registros, arquivos e controles contábeis específicos no local onde forem contabilizados os documentos originais fiscais ou equivalentes, comprobatórios das

- despesas realizadas com recursos do presente CONVÊNIO pelo prazo de 10 (dez) anos, contado da data da aprovação por ITAIPU da Prestação de Contas Final;
- o) realizar as despesas para execução do objeto do CONVÊNIO, expresso no Plano de Trabalho, dentro da vigência deste Instrumento;
 - p) apresentar relatórios técnicos e financeiros contendo avaliação qualitativa e quantitativa acerca dos resultados obtidos com a execução do projeto, detalhando a metodologia empregada para a execução das metas previstas no Plano de Trabalho, bem como análise do impacto social sobre o público alvo beneficiado e sobre o problema e/ou demanda que deu origem ao projeto; e
 - q) fazer constar em contratos com seus fornecedores, a obrigação das contratadas para, quando da emissão de notas fiscais ou equivalentes para as CONVENIADAS, indicar no corpo das notas fiscais ou equivalentes, o número do instrumento jurídico firmado entre ITAIPU e as CONVENIADAS, fonte dos recursos financeiros.

CAPÍTULO V

DOS RECURSOS FINANCEIROS

CLÁUSULA SEXTA - Os valores a serem repassados pela ITAIPU para a execução deste CONVÊNIO são os estabelecidos no item 24 - CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO FINANCEIRO, previsto no Plano de Trabalho - Anexo I deste CONVÊNIO, em consonância com as metas, etapas ou fases de execução do objeto deste CONVÊNIO.

CLÁUSULA SÉTIMA - Os recursos repassados pela ITAIPU, enquanto não empregados na sua finalidade, deverão permanecer aplicados, obrigatoriamente, nos seguintes produtos financeiros:

- I) caderneta de poupança de instituição financeira oficial; ou
- II) fundo de aplicação financeira de curto prazo e/ou em operação de mercado aberto, ambos lastreados em títulos da dívida pública federal.

Parágrafo único - Mediante prévia formalização de Aditamento e segundo procedimentos específicos estabelecidos por ITAIPU em suas normas internas, os rendimentos das aplicações financeiras poderão ser aplicados no objeto deste CONVÊNIO e estarão sujeitos às mesmas condições de Prestação de Contas exigidas para os recursos transferidos.

CAPÍTULO VI

DA FORMA E CONDIÇÕES DA TRANSFERÊNCIA DOS RECURSOS FINANCEIROS

CLÁUSULA OITAVA - A ITAIPU efetuará o repasse de recursos financeiros de sua responsabilidade, de acordo com o item 24 - CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO FINANCEIRO, estabelecido no Plano de Trabalho- Anexo I deste CONVÊNIO.

CLÁUSULA NONA - O repasse da primeira parcela trimestral será efetuado em até 15 (quinze) dias corridos contado a partir da data de protocolo na ITAIPU da solicitação de repasse pela CONVENIADA responsável pela execução, com indicação da conta corrente específica e exclusiva para depósito, condicionado à assinatura do presente CONVÊNIO.

CLÁUSULA DÉCIMA - O repasse das demais parcelas trimestrais será efetuado em até 30 (trinta) dias corridos contado a partir da data de protocolo na ITAIPU da solicitação de

repassa pela CONVENIADA responsável pela execução, condicionado à análise da regularidade física e financeira da Prestação de Contas pela ITAIPU correspondente ao repasse anterior.

CLÁUSULA DÉCIMA PRIMEIRA - Trimestral e preferencialmente até o 10º (décimo) dia útil do mês subsequente ao trimestre da realização das atividades, a CONVENIADA responsável pela execução da meta, diretamente interessada no recebimento do valor, deverá encaminhar para a Central de Protocolo da ITAIPU aos cuidados do gestor da ITAIPU, os seguintes documentos:

- I) correspondência solicitando o repasse dos recursos financeiros da próxima parcela, se houver; e
- II) Prestação de Contas, conforme previsto no Capítulo VIII - “DAS PRESTAÇÕES DE CONTAS”.

Parágrafo único - Será admitido período inferior ao trimestre, compreendido em prestações de contas parciais.

CLÁUSULA DÉCIMA SEGUNDA - Os recursos financeiros serão repassados à CONVENIADA, responsável pela execução, mediante crédito em conta corrente específica e exclusiva deste CONVÊNIO, aberta em instituição bancária oficial. A CONVENIADA deverá informar à ITAIPU o banco e o número da conta, bem como o número, o nome e a localização da agência. O crédito em conta corrente será efetuado mediante depósito, por meio de Transferência Eletrônica Disponível - TED. O comprovante do depósito passará a ser, automaticamente, o recibo de efetivação do repasse.

Parágrafo primeiro - A liberação dos recursos financeiros será suspensa total ou parcialmente no caso de descumprimento de qualquer cláusula prevista neste CONVÊNIO.

Parágrafo segundo - O gestor da ITAIPU poderá solicitar a suspensão da utilização dos recursos financeiros transferidos, no caso de inadimplemento pelas CONVENIADAS de qualquer cláusula prevista neste CONVÊNIO.

Parágrafo terceiro - A não aprovação das Prestações de Contas Parciais pela ITAIPU, por falta de documentos ou por outros motivos, poderá implicar na solicitação de suspensão da utilização dos recursos transferidos e/ou implicará na suspensão de repasses, até que os problemas sejam sanados.

Parágrafo quarto - Os recursos financeiros repassados deverão ser mantidos em aplicação financeira vinculada às contas específicas e exclusivas até a sua utilização.

CAPÍTULO VII

DO INADIMPLEMENTO

CLÁUSULA DÉCIMA TERCEIRA - São vedadas as despesas porventura realizadas com finalidade diversa da estabelecida neste Instrumento, especialmente:

- a) com finalidade diferente ao objeto do CONVÊNIO, inclusive em caráter de emergência;
- b) a título de taxas de administração, gerência ou similar;

- c) relativas a gastos de representação, gratificações, festas e homenagens;
- d) efetuadas em data anterior ou posterior à vigência do CONVÊNIO;
- e) relativas a multas, juros ou correção monetária, resultante do cumprimento de obrigações fora do prazo;
- f) a empregado da ITAIPU, a qualquer título;
- g) de qualquer natureza, a diretor, presidente, dirigente, conselheiro ou representante legal das CONVENIADAS, de seus respectivos cônjuges, ascendentes e descendentes, até o segundo grau de consanguinidade e afinidade, ou, ainda, a pessoas jurídicas em que esses sejam proprietários, sócios ou exerçam função de direção;
- h) consultoria em percentual superior a 30% (trinta por cento) do valor total do CONVÊNIO; e
- i) outras vedações previstas nas Instruções de Serviços da ITAIPU.

Parágrafo único - O inadimplemento das CONVENIADAS implicará na suspensão de transferências ou fornecimentos, gerando a obrigação de devolução dos recursos financeiros ainda não utilizados, com a correção correspondente, e, se for o caso, a entrega do bem, equipamento ou material fornecido.

CAPITULO VIII

DAS PRESTAÇÕES DE CONTAS

CLÁUSULA DÉCIMA QUARTA - A Prestação de Contas é a comprovação de que os recursos previstos neste CONVÊNIO tiveram boa e regular aplicação. Portanto, deve evidenciar que os recursos foram utilizados de acordo com as atividades previstas neste CONVÊNIO em conformidade ao que foi pactuado entre as partes no Plano de Trabalho.

Parágrafo primeiro - As Prestações de Contas deverão:

- a) ser preparadas em 2 (duas) vias de igual teor, sendo uma das vias entregue aos cuidados do gestor da ITAIPU dentro do prazo estabelecido neste CONVÊNIO;
- b) ter seus documentos unidos de forma a não permitir o desmembramento accidental de suas peças;
- c) ter suas páginas numeradas sequencialmente (1/n);
- d) conter os documentos devidamente preenchidos e assinados; e
- e) ser preparadas e entregues em meio físico e digital.

Parágrafo segundo - O gestor deste CONVÊNIO, na ITAIPU, orientará quais documentos deverão ser apresentados em meio físico (cópia em papel) e/ou digital (arquivos indexados em *pendrive*, CD, DVD ou disponibilizados em nuvem, *dropbox*, *google*, bem como outras formas equivalentes).

Parágrafo terceiro - Caso a ITAIPU disponibilize sistema informatizado, as prestações de contas deverão ser apresentadas por via do referido sistema.

CLÁUSULA DÉCIMA QUINTA - As faturas, recibos, notas fiscais e quaisquer outros documentos comprobatórios de despesas deverão:

- a) referir-se a despesas compatíveis com o objeto deste CONVÊNIO e previstas no Plano de Trabalho;

- b) referir-se a despesas realizadas no período de vigência deste CONVÊNIO;
- c) ser emitidos em nome da CONVENIADA responsável pela respectiva execução;
- d) conter o número deste CONVÊNIO nos documentos originais, estar legíveis e sem emendas ou rasuras;
- e) conter e/ou estar acompanhados do detalhamento das parcelas de valores que correspondam a mais de uma fonte de origem de recursos utilizados para o respectivo pagamento, identificando cada fonte;
- f) conter carimbo de recebimento do material e/ou atestado da realização dos serviços, com identificação e assinatura do responsável; e
- g) ser mantidos em arquivo em boa ordem, no próprio local em que forem contabilizados, à disposição da ITAIPU, pelo prazo de 10 (dez) anos contado a partir da data de aprovação da Prestação de Contas Final.

CLÁUSULA DÉCIMA SEXTA - As CONVENIADAS ficam obrigadas a apresentarem as Prestações de Contas Parciais e Final de todos os gastos realizados relativos aos recursos financeiros a que se referem, de acordo com o estabelecido neste CONVÊNIO e nas normas internas da ITAIPU, que regem o tema e que serão disponibilizadas para as CONVENIADAS pelo gestor da ITAIPU.

CLÁUSULA DÉCIMA SÉTIMA - A ITAIPU fará o acompanhamento da execução deste CONVÊNIO, além do exame das despesas, com avaliação técnica relativa à aplicação dos recursos de que trata a Prestação de Contas referida neste Capítulo, a fim de verificar a correta aplicação dos recursos e o atingimento dos objetivos estabelecidos.

CAPÍTULO IX

DAS PRESTAÇÕES DE CONTAS PARCIAIS

CLÁUSULA DÉCIMA OITAVA - As CONVENIADAS apresentarão à ITAIPU a(s) Prestação(ões) de Contas Parcial(is) correspondente(s) ao trimestre anterior, com a seguinte documentação:

- a) correspondência de encaminhamento da Prestação de Contas;
- b) Relatório de Atividades e de Resultados;
- c) Relatório de Execução Físico-Financeira;
- d) Demonstrativo da Execução da Receita e Despesa (Balancete Financeiro);
- e) Conciliação dos Saldos Bancários;
- f) cópia do extrato da conta bancária específica e exclusiva referente ao período das contas em análise;
- g) Demonstrativo de Rendimentos de Aplicações Financeiras;
- h) cópia do extrato de aplicação financeira;
- i) Certidão Negativa de Débitos Relativos aos Tributos Federais e à Dívida Ativa da União (RFB/PGFN), Certificado de Regularidade do FGTS (CRF), Certidão Negativa de Débito Municipal (CND), Certidão Negativa de Débito Estadual (CND) e Certidão Negativa de Débitos Trabalhistas (CNDT);
- j) Demonstrativo de Repasses e Prestações de Contas;
- k) cópia do despacho adjudicatório e homologação das licitações realizadas ou justificativas para sua dispensa ou inexigibilidade ou documentos de objetivos equivalentes estabelecidos em regulamento próprio das CONVENIADAS;

- l) na ausência de regulamento próprio das CONVENIADAS com objetivos equivalentes aos atos de adjudicação e homologação de licitações, cópia da cotação de preços, contendo as propostas de no mínimo três fornecedores e a indicação, pelas CONVENIADAS, da mais adequada para o fornecimento do objeto deste CONVÊNIO. Não havendo possibilidade de obter no mínimo três propostas comerciais, será apresentada a justificativa pertinente, por escrito. O Gestor do CONVÊNIO da ITAIPU orientará, por escrito, as CONVENIADAS sobre quais itens de fornecimentos previstos no Plano de Trabalho se submetem ao envio de comprovantes da realização das cotações de preços junto às Prestações de Contas remetidas para a ITAIPU;
- m) relação de bens (adquiridos, produzidos ou construídos com os recursos da ITAIPU);
- n) relação de pagamentos efetuados com recursos da ITAIPU;
- o) relação de pagamentos efetuados a título de contrapartida das CONVENIADAS (quando houver);
- p) cópias dos comprovantes de todas as despesas realizadas com recursos da ITAIPU; e
- q) declaração de cumprimento das obrigações trabalhistas, tributárias, previdenciárias e legais referente aos empregados, autônomos, estagiários e bolsistas, nos casos em que haja pagamentos a pessoas físicas.

Parágrafo único - Identificada inconsistência na Prestação de Contas Parcial, o gestor da ITAIPU emitirá correspondência às CONVENIADAS comunicando: (a) a identificação das inconsistências; (b) o prazo de 30 (trinta) dias corridos a partir da data de comunicação para correção das inconsistências; e (c) que a não correção das inconsistências no prazo indicado, poderá ocasionar a suspensão das transferências.

CAPÍTULO X

DA PRESTAÇÃO DE CONTAS FINAL

CLÁUSULA DÉCIMA NONA - As CONVENIADAS apresentarão à ITAIPU a Prestação de Contas Final, em no máximo 60 (sessenta) dias corridos contados a partir da data de final de vigência deste CONVÊNIO, contendo, além dos documentos referentes à Prestação de Contas Parcial, os seguintes documentos:

- a) Relatório de Cumprimento do Objeto;
- b) Parecer Contábil, com assinatura do contador;
- c) Termo de Guarda de Documentos;
- d) cópia deste CONVÊNIO e aditivos;
- e) cópia do Plano de Trabalho aprovado e vigente; e
- f) cópia do termo de instalação e funcionamento de equipamento (quando houver).

CLÁUSULA VIGÉSIMA - Identificada inconsistência na Prestação de Contas Final, o gestor da ITAIPU emitirá correspondência às CONVENIADAS comunicando: (a) a identificação das inconsistências; (b) o prazo de 30 (trinta) dias corridos contado a partir da data de comunicação para correção das inconsistências; e (c) que a não correção das inconsistências no prazo indicado, poderá ocasionar a suspensão das transferências, inclusive em outros instrumentos contratuais celebrados entre a ITAIPU e as CONVENIADAS.

Parágrafo único - Transcorrido o prazo sem que as irregularidades/inconsistências tenham sido solucionadas, a Prestação de Contas Final não será aprovada e será emitido Aviso de Débito para a devolução dos recursos indevidamente aplicados, devidamente corrigidos.

CAPÍTULO XI

DEVOLUÇÃO DE SALDOS

CLÁUSULA VIGÉSIMA PRIMEIRA - As CONVENIADAS se comprometem a devolver no prazo máximo de 30 (trinta) dias corridos após a conciliação de conta vinculada a este CONVÊNIO, saldos originados:

- a) da não apresentação, no prazo exigido, da Prestação de Contas Final;
- b) dos rendimentos de aplicação financeira (realizada ou apurada) dos recursos recebidos da ITAIPU, exceto mediante formalização de aditamento e essa utilização seja efetivada sob validação do respectivo valor pela Área Financeira;
- c) da não aprovação da Prestação de Contas em decorrência de:

- I - inexecução total ou parcial do objeto pactuado;
- II - utilização dos recursos transferidos de forma diversa da pactuada;
- III - impugnação de despesas, se realizadas em desacordo com as disposições deste CONVÊNIO; e
- IV - ausência de documentos exigidos na Prestação de Contas que comprometa a avaliação e análise quanto à boa e regular aplicação dos recursos.

Parágrafo único - Para eventual devolução de saldos financeiros à ITAIPU, as CONVENIADAS deverão entrar em contato com o gestor da ITAIPU, para receber as informações referentes aos procedimentos a serem adotados para a devolução dos recursos.

CAPÍTULO XII

DOS BENS MATERIAIS

CLÁUSULA VIGÉSIMA SEGUNDA - Os bens patrimoniais adquiridos, produzidos, transformados ou construídos com os recursos oriundos da ITAIPU permanecerão sob a guarda e responsabilidade das CONVENIADAS durante a vigência deste Instrumento.

Parágrafo primeiro - Findo o presente CONVÊNIO, observado o fiel cumprimento do objeto e das obrigações pactuadas, os bens patrimoniais acima referidos poderão ser revertidos à BENEFICIÁRIA, a critério de ITAIPU, desde que solicitado quando da Prestação de Contas Final e, mediante justificativa do gestor do CONVÊNIO no Parecer Técnico Conclusivo acerca das atividades e metas realizadas, aprovado pelo Diretor da Área Gestora.

Parágrafo segundo - Caso verifique-se irregularidades no CONVÊNIO, os bens patrimoniais serão automaticamente revertidos à ITAIPU.

CAPÍTULO XIII

DA PROPRIEDADE E DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

CLÁUSULA VIGÉSIMA TERCEIRA - A propriedade dos inventos, aperfeiçoamentos, métodos, processos, meios de obtenção, produtos, tecnologias, resultados, metodologias e inovações técnicas porventura gerados e desenvolvidos em decorrência deste Instrumento serão de propriedade comum dos partícipes em proporções a serem discutidas caso a caso e formalizadas por meio de aditamento.

CLÁUSULA VIGÉSIMA QUARTA - Os partícipes se comprometem a submeter ao consentimento formal do outro, previamente à divulgação, quaisquer trabalhos resultantes da colaboração prevista neste CONVÊNIO, bem como a mencionar explicitamente a natureza e a proveniência da cooperação recebida.

CAPÍTULO XIV DAS COMUNICAÇÕES ENTRE OS PARTICÍPES

CLÁUSULA VIGÉSIMA QUINTA - Todas as comunicações entre os partícipes deverão ser feitas por escrito aos gestores designados conforme termos da Cláusula Terceira e protocoladas no ato do recebimento. Quando dirigidas à ITAIPU, deverão ser encaminhadas à:

ITAIPU - SUPERINTENDÊNCIA DE MEIO AMBIENTA
Av. Tancredo Neves, 6731
CEP: 85866-900 Foz do Iguaçu-PR

Quando dirigidas às CONVENIADAS, deverão ser encaminhadas ao:

FUNDAÇÃO PARQUE TECNOLÓGICO ITAIPU - FPTI - BRASIL
Av. Tancredo Neves, 6731
CEP: 85867-000 Foz do Iguaçu-PR

UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICA - UNILA
Avenida Silvio Ssdelli, 1842 Vila "A" Edifício Comercial Lorivo
CEP: 85866-000 Foz do Iguaçu -PR

CAPÍTULO XV DO ADITAMENTO

CLÁUSULA VIGÉSIMA SEXTA - Este CONVÊNIO poderá excepcionalmente ser alterado por aditamento.

Parágrafo primeiro - A solicitação de alteração formulada pela CONVENIADA que o propuser deverá estar devidamente justificada e ser apresentada no prazo de até 30 (trinta) dias antes do término da vigência deste instrumento, a qual será previamente apreciada pela ITAIPU e, se aprovada, incorporada ao CONVÊNIO mediante aditamento ou relatório.

Parágrafo segundo - As adequações no Plano de Trabalho de natureza meramente operacional, que não constituam alterações significativas do CONVÊNIO, poderão ser realizadas por um Relatório justificado dos Gestores com a aprovação do Diretor da Área Gestora da ITAIPU, conforme modelo disponibilizado pela ITAIPU.

CAPÍTULO XVI DA RESCISÃO

CLÁUSULA VIGÉSIMA SÉTIMA - Este instrumento poderá ser rescindido por qualquer das partes, desde que aquela que assim o desejar comunique às demais por escrito, com antecedência mínima de 90 (noventa) dias.

Parágrafo primeiro - O CONVÊNIO também poderá ser rescindido no caso de inadimplemento de quaisquer de suas Cláusulas, especialmente quando constatadas as seguintes situações:

- a) utilização dos recursos em desacordo com o Plano de Trabalho;
- b) falta de apresentação das Prestações de Contas nos prazos estabelecidos; ou
- c) não aprovação das prestações de contas.

Parágrafo segundo - Ocorrendo à rescisão deste CONVÊNIO ficam os partícipes responsáveis pelas obrigações decorrentes do prazo em que tenha vigido este Instrumento, bem como se responsabilizando pela conclusão das atividades em andamento, mediante acordo específico firmado entre as partes.

CAPÍTULO XVII VALOR DO CONVÊNIO

CLÁUSULA VIGÉSIMA OITAVA - Para todos os efeitos legais, dá-se ao presente CONVÊNIO o valor total de R\$ 4.778.267,51 (quatro milhões setecentos e setenta e oito mil duzentos e sessenta e sete reais e cinquenta e um centavos), sendo R\$ 2.387.939,20 (dois milhões trezentos e oitenta e sete mil novecentos e trinta e nove reais e vinte centavos) provenientes da participação financeira da ITAIPU, com participações econômicas da Fundação Parque Tecnológico Itaipu - Brasil - FPTI no valor de R\$ 374.528,31 (trezentos e setenta e quatro mil quinhentos e vinte e oito reais e trinta e um centavos), e da Universidade Federal da Integração Latino-Americana - UNILA no valor de R\$ 2.015.800,00 (dois milhões quinze mil e oitocentos reais).

CAPÍTULO XVIII DA VIGÊNCIA

CLÁUSULA VIGÉSIMA NONA - O presente CONVÊNIO tem vigência de 30 meses, contado a partir da data da sua assinatura.

CAPÍTULO XIX DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

CLÁUSULA TRIGÉSIMA - Os termos e condições deste CONVÊNIO prevalecerão sobre quaisquer outros entendimentos ou acordos anteriores entre as partes, verbais ou escritos, referentes às condições nele estabelecidas.

CLÁUSULA TRIGÉSIMA PRIMEIRA - A omissão ou tolerância das partes em exigir o fiel cumprimento das disposições ora pactuadas não constituirá novação ou renúncia, nem lhes afetarão o direito de exigir, a qualquer tempo, o fiel cumprimento do avençado.

CLÁUSULA TRIGÉSIMA SEGUNDA - Os casos omissos e/ou situações contraditórias deste CONVÊNIO deverão ser resolvidos mediante conciliação dos partícipes, à luz da legislação e dos regulamentos que regem a matéria, com prévia comunicação por escrito da ocorrência, consignando prazo para resposta e, no mínimo, 10 (dez) dias.

CLÁUSULA TRIGÉSIMA TERCEIRA - As CONVENIADAS declaram conhecer e respeitar a Política e as Diretrizes de Equidade de Gênero da ITAIPU.

CAPÍTULO XX DO FORO

CLÁUSULA TRIGÉSIMA QUARTA - Fica eleito o foro da Justiça Federal, Seção Judiciária de Foz do Iguaçu-PR, com renúncia expressa de qualquer outro por mais privilegiado que seja, para dirimir eventuais dúvidas oriundas deste CONVÊNIO.

E, por estarem assim, de pleno acordo, assinam digitalmente o presente instrumento, para que produza seus devidos e legais efeitos.

Foz do Iguaçu,

P/ ITAIPU:¹

DIRETOR FINANCEIRO EXECUTIVO

DIRETOR FINANCEIRO

P/ FPTI:

DIRETOR

DIRETOR

P/ UNILA:

REITOR

TESTEMUNHAS:

¹
DET/FE/FD/0177/20
JDA.JD

1. TÍTULO DO PROJETO

**Efeito de micropoluentes na biodiversidade de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR – PY).
Fase 2: Estabelecendo protocolos de biomonitoramento por meio da integração de diferentes níveis da biodiversidade (genético e comunidades) e métodos de estudos (clássicos e moleculares).**

2. PRAZO

30 meses a partir da assinatura do convênio

3. PATROCÍNIO

Patrocinadores do Projeto	Instituição
Gen. Luiz F. K. Carbonell (DC.CD)	ITAIPU Binacional (BR)
Miguel Angel Gomez Acosta (DC.CE)	ITAIPU Binacional (PY)
Dr. Gleisson A. Pereira de Brito	UNILA
Gen. Eduardo Castanheira Garrido Alves	FPTI-BR

4. RESPONSÁVEL TÉCNICO PELO PROJETO

Coordenação Geral		
Responsáveis Técnicos	IB - BR	Simone Frederigi Benassi e Jussara Elias de Souza
	IB - PY	Ana Carolina Gossen Siani
	FPTI-BR	Rolf Massao Satake Gugisch
	UNILA	Dr. Cleto Kaveski Peres e Dr. Luiz H. Garcia Pereira
Responsáveis Administrativos	IB	Fabricio Baron Mussi
	FPTI-BR	Rolf Massao Satake Gugisch

J-6

5. ALINHAMENTO ESTRATÉGICO

O desenvolvimento desta pesquisa será realizado binacionalmente e está alinhado aos seguintes objetivos estratégicos da Itaipu Binacional:

OE 4. Desenvolvimento sustentável das áreas de influência, considerada as especificidades de cada país: garantir que as ações diretas de ITAIPU em ambos os países estejam alinhadas com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), com vistas à melhoria da qualidade de vida e um desenvolvimento social e econômico justo, respeitando o meio ambiente.

OE 7. Garantir a segurança hídrica, consolidando o processo de gestão socioambiental por bacia hidrográfica: recuperar, conservar e preservar as bacias hidrográficas e o reservatório, garantindo a segurança hídrica, por meio de ações permanentes e integradas que promovam o uso sustentável dos recursos naturais, a melhoria das condições socioambientais e a melhoria da disponibilidade de água em quantidade e qualidade para os diversos usos.

OE 8. Fomentar o desenvolvimento social, econômico, ambiental e cultural na área de influência, consideradas as especificidades de cada país: aproveitar a importância estratégica e a força articuladora da ITAIPU para promover, em parceria com os governos locais, entidades não governamentais e órgãos internacionais de desenvolvimento, iniciativas estruturantes para geração de emprego, renda e bem-estar social em ambos os países.

OE 9. Conservar o meio ambiente e a diversidade biológica, integrando a comunidade: recuperar e conservar os bens materiais, realizar pesquisa da biodiversidade em áreas protegidas, envolvendo a comunidade, criando consciência ambiental na sociedade, promovendo a mudança no modo de ser, viver, produzir e consumir, buscando autossuficiência alimentar com geração sustentável de renda e articulando com instituições para criar convênios e compromissos efetivos.

OE 11. Fomentar a pesquisa e a inovação para o desenvolvimento energético e

tecnológico, com ênfase na sustentabilidade: pesquisar e apoiar iniciativas de inovação tecnológica e de desenvolvimento de fontes de energia renováveis e limpas, buscando-se a eficiência energética e o desenvolvimento sustentável em ambos os países.

Quanto ao Planejamento Estratégico da Fundação Parque Tecnológico Itaipu – Brasil (FPTI-BR), o projeto está alinhado aos seguintes Objetivos Estratégicos:

M1- Atender às demandas de soluções tecnológicas da Itaipu Binacional

Atender às demandas de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica da Itaipu Binacional.

M2- Expandir o desenvolvimento de soluções para a iniciativa privada e a área pública

Desenvolver soluções para a iniciativa privada e área pública, considerando a geração de receitas, a prospecção de novos clientes, os serviços e produtos ofertados.

M3- Atrair e manter agentes da trílice hélice para consolidar o ecossistema de inovação

Atrair e consolidar instituições dos setores público e privado (agências de fomento e financiamento, instituições financeiras, empresas públicas e privadas, instituições de ensino e pesquisa etc.) cujas atividades e interações gerem, adotem, importem, modifiquem e difundam novas tecnologias, sendo a inovação e o aprendizado seus aspectos cruciais.

6. APRESENTAÇÃO

Os resultados obtidos até o momento no projeto Micropoluentes II demonstram a necessidade da compreensão continuada sobre os sistemas ecológicos e a relação dos efeitos causados pela presença e dispersão de agrotóxicos no meio aquático. Diante disso, o presente projeto foi elaborado como uma proposta de continuidade e ampliação do monitoramento da biodiversidade de algas, macroinvertebrados bentônicos e peixes e a presença de agrotóxicos nas águas dos riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR – PY). Além disso, haja vista o

conceito de biomagnificação, é possível que parte dos agrotóxicos sejam bioacumulados nas espécies aquáticas, levando o interesse na determinação desses compostos alvo em matrizes biológicas como o fígado de peixe.

O conhecimento da paisagem, screening, algas, macroinvertebrados e peixes que serão agregados, fortalece a geração de um panorama ambiental da região transfronteiriça.

A parceria ITAIPU Binacional, FPTI-BR e UNILA se caracteriza pela geração informações científicas de alta qualidade, fortalecendo o monitoramento da qualidade da água e a cooperação para a gestão de recursos hídricos da nossa região transfronteiriça.

7. JUSTIFICATIVA DA ESCOLHA DAS CONVENIADAS

A UNILA foi fundada em 2010. Uma universidade nova e com uma proposta diferenciada das demais, objetivando principalmente a integração dos países Latino-americanos através da educação. A instituição é equipada, desde 2013, com diversos equipamentos de cromatografia (CG-MS, CG-ECD, HPLC-DAD-FD e dois CG-FID). Desta maneira, a criação de novos projetos para a utilização dos equipamentos, a criação de novas linhas de pesquisa e a continuidade de linhas de pesquisas já existentes, como o projeto em questão, promovem a sustentabilidade científica, tecnológica e de inovação da região. Além disso, o presente projeto é também a consolidação da criação de elos entre a Itaipu Binacional, UNILA e FPTI-BR, visando o atendimento contínuo de demandas de todas as instituições para pesquisa e desenvolvimento científico, agregando nesta segunda fase o monitoramento de micropoluentes e sua relação com a biodiversidade nos rios, em diferentes níveis de análise, em ambas as margens do Reservatório de Itaipu (BR-PY), fato este inovador.

A expertise da FPTI-BR na atuação e qualificação profissional nos diferentes níveis acadêmicos propicia o desenvolvimento do projeto em questão, pois cria melhores condições para fortalecimento e fixação do conhecimento em nossa região transfronteiriça. Além disso, profissionais qualificados, como químicos e biólogos, com experiência na área do presente projeto atuarão de forma expressiva na geração e análise de dados. Ainda, funções administrativas como gerenciamento de aquisições e contratações serão executadas pelo PTI. Através do Centro de Competência em Inteligência e Gestão Territorial (IT.DT) espaço técnico-científico de colaboradores de Itaipu, PTI e Instituições colaboradoras externas, a integração de pesquisas em diversas

áreas científico-tecnológicas é realidade em áreas temáticas chave: território, água, clima, biodiversidade e energia. Além disso, compete ao IT.DT a organização e disponibilização de dados e informações, estatísticas geradas nos projetos vinculados, facilitando o acesso a informações e diálogos sobre o desenvolvimento da região. O projeto prevê ainda parcerias com outras instituições de ensino como UNESP e UNIP, as quais já foram iniciadas no projeto Micropoluentes na BP3 e foram bem sucedidas. A parceria pressupõe troca de conhecimento e a participação no projeto de alunos bolsistas em cursos de pós-graduação que por ora ainda não estão estabelecidos em nossa região ou ainda em áreas específicas de conhecimento.

Além do impacto científico que os resultados promoverão para a região transfronteiriça, existe também o impacto intelectual decorrente da formação de pessoas. Sendo neste caso, não somente a formação de alunos e também a troca de conhecimento e experiências entre os diversos profissionais técnicos e acadêmicos de ambos os países que trabalharão para o desenvolvimento do projeto e interpretação dos resultados.

É importante enfatizar que que projetos desta natureza, envolvendo as equipes técnicas de Itaipu (margem brasileira e paraguaia) e instituições acadêmicas descritas anteriormente, promovem a integração e beneficia o manejo e conservação das águas do Reservatório de Itaipu, as quais unem nossa região transfronteiriça.

8. INTRODUÇÃO

O Reservatório de Itaipu está localizado em uma região de fronteira cujo rio compartilhado (rio Paraná) pode ser denominado transfronteiriço. Rios transfronteiriço, segundo o Glossário de Termos Referentes à Gestão de Recursos Hídricos (BRASIL, 2008) corresponde ao rio contínuo, comumente empregado como sinônimo de rio internacional ou rio compartilhado.

Ao compartilhar o rio Paraná para a produção de energia, a Itaipu traz um grande exemplo de como duas nações podem trabalhar em conjunto para a produção de energia. É nesse sentido de compartilhamento que se propõem esse projeto temático, considerando que todo o uso e ocupação do solo das bacias de drenagem correspondentes a ambas as margens deságuam no Reservatório de Itaipu (Figura 1).

3:6

Figura 1 - Mapa com a localização das Bacias de drenagem que desaguam no Reservatório de Itaipu.



Fonte: Divisão de Geoprocessamento – Itaipu Binacional.

Um dos grandes desafios atuais da humanidade se trata do conhecimento da biodiversidade, a qual é definida pela variedade e a variabilidade existente entre os organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais elas ocorrem (BRASIL, 2005; MARENGO, 2006). Os estudos atuais demonstram claramente que somente uma pequena fração da biodiversidade é conhecida e tem sido estudada, o que se torna bastante grave, já que vivemos em um período de intensa exploração e degradação de recursos naturais e, logicamente, muitas espécies estão sendo perdidas antes mesmo do seu registro (CHAPIN et al., 1995; CEBALLOS et al., 2015). Neste sentido, existe um esforço muito grande de instituições do mundo todo em viabilizar trabalhos que enfoquem o conhecimento da biodiversidade, além de ações e projetos para a sua conservação.

Os ambientes aquáticos continentais, apesar de ocuparem menos de 1% da superfície do planeta, abrigam cerca de 10% de todas as espécies conhecidas e cerca de um terço das espécies de vertebrados (STRAYER & DUDGEON, 2010). Assim, a biodiversidade aquática representa uma valiosa fonte de recursos naturais e iniciativas que promovam a sua conservação são indispensáveis, uma vez que a maioria das atividades humanas está diretamente relacionada a tais ecossistemas (DUDGEON et al., 2006). Entretanto, os impactos antrópicos, em diferentes níveis, vêm contribuindo para a

redução da heterogeneidade ambiental e, consequentemente, levando à redução da diversidade de espécies, sendo que, os ecossistemas aquáticos continentais são extremamente vulneráveis a esses impactos (SMITH & PETRERE, 2000; ALLAN, 2004). Estudos recentes têm demonstrado que essa enorme biodiversidade ocorrente nestes ambientes está sendo fortemente ameaçada (VÖRÖSMARTY et al., 2010), o que vem levando à redução da biodiversidade e homogeneização das comunidades aquáticas (VILAR et al., 2014; ZORZAL-ALMEIDA et al., 2017).

Ambientes lóticos em particular são, de maneira geral, ambientes de águas continentais correntes, tendo como exemplos básicos rios, riachos e córregos. O fluxo unidirecional, a ausência de estratificação térmica, e a alta variação das condições físico-químicas e estruturais, tanto espacial quanto temporalmente, adicionado a um efeito mais pronunciado da erosão e de um fluxo mais intenso de nutrientes, conferem aos ambientes lóticos uma notável diferença em relação aos ambientes lênticos representados por lagos, lagoas, etc. (MAITLAND, 1978). Considerando a crescente preocupação com a conservação de espécies e ambientes, os sistemas lóticos podem ser considerados muito importantes, visto que suas peculiaridades fazem dele um ambiente que abriga uma enorme quantidade de espécies (ALLAN & CASTILLO, 2007), além de se tornar essencial em alguma parte do ciclo de vida de muitos outros (GILLER & MALMQVIST, 1998). Além disso, grande parte da água para o consumo humano provém deste tipo de ambiente e, seu enorme contato com a matriz terrestre (bacia de drenagem), possibilita que os impactos das atividades humanas sejam rapidamente levados para o seu interior. Neste sentido, dados mostram que aproximadamente 80% da população está sujeita a escassez de água em razão do mau uso dos rios (VÖRÖSMARTY et al., 2010).

Desta forma, a realização de monitoramentos em riachos passa a ser de enorme interesse para detectar alterações em toda a paisagem (BARBOUR et al., 1999) e a utilização do componente biótico (biomonitoramento de comunidades aquáticas) para este tipo de estudo é fortemente recomendado e reconhecido pela literatura especializada (BARBOUR et al., 1999; Allan & CASTILLO, 2007; NESSIMIAN et al., 2008). Assim, conhecer e monitorar a biota destes ambientes pode servir como uma importante ferramenta para detectar o efeito do uso e ocupação diferenciados, além de contribuir com dados para o planejamento e gestão das bacias hidrográficas que os compõem.

Os diferentes organismos que compõem as comunidades de ambientes lóticos

J.C

variam ao longo de um gradiente espaço-temporal (GILLER & MALMQVIST, 1998). Desta forma, impactos de diferentes origens podem ser registrados ao longo destes gradientes investigando sua biota. Ainda neste contexto, a investigação de diferentes comunidades pode fornecer informações não visualizadas quando um único tipo de organismo é observado, de forma que uma abordagem integrada de componentes distintos da biota pode levar a resultados mais consistentes (BARBOUR et al., 1999). Por exemplo, o aumento da disponibilidade de nutrientes ou perda de vegetação ciliar podem, muitas vezes, levar a aumentos expressivos nos valores de riqueza e abundância para algas (CHASE, 2010; PERES et al., 2017), enquanto que, para peixes, por exemplo, pode-se verificar o efeito contrário. Por outro lado, a biodiversidade aquática vem sendo negativamente associada a elevados níveis de adição de nutrientes, principalmente quando eles provêm de atividades antropogênicas (ZORZAL-ALMEIDA et al., 2017, WENGRAT et al., 2017). Assim, análises integradas com diferentes representantes da biodiversidade e de suas relações ecológicas se fazem necessárias para revelar padrões complexos de interação e funcionamento deste tipo de ambiente.

Dentro da problemática ambiental, a perda de espécies e extinções locais estão entre os maiores problemas na atualidade. Essas extinções locais de espécies têm sido atribuídas, principalmente, à perda e fragmentação de habitats (DONOHUE et al., 2009) e nos ambientes aquáticos continentais a perda de espécies está particularmente relacionada com as atividades humanas desenvolvidas na bacia de drenagem. No entanto, pouco se conhece sobre outros fatores que possam influenciar a ocorrência e distribuição das espécies nos ecossistemas aquáticos, como é o caso da presença de micropoluentes. Micropoluentes ou Contaminantes Emergentes (CE) são termos que definem, de forma ampla, “qualquer produto químico sintético ou de ocorrência natural, ou ainda qualquer micro-organismo que não é comumente monitorado, mas tem potencial para entrar no ambiente com efeitos adversos conhecidos ou suspeitos à ecologia e/ou à saúde humana” (UNESCO, 2017). Dentre a lista de substâncias xenobióticas consideradas micropoluentes, os pesticidas tem papel de destaque pela utilização em larga escala. Dependendo das características físico-químicas, alguns agrotóxicos são facilmente lixiviados para os ecossistemas aquáticos, podendo alcançar diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (AMARANTE JUNIOR et al., 2002); outras podem ficar adsorvidas em partículas de solo e sedimento (LAABS et al 2002; POSSAVATZ et al, 2014). Assim,

estudos que monitoram a biodiversidade e as suas respostas frente a esses contaminantes passam a ser de enorme interesse, uma vez que a agricultura está entre as principais atividades econômicas desenvolvidas no Brasil, sobretudo no oeste do Paraná e em todo o território do Paraguai. Em termos regionais, os estudos enfocando as respostas da biodiversidade aquática frente as concentrações a serem quantificadas destas substâncias representam uma etapa fundamental para qualquer tipo de abordagem aplicada como os planos de conservação do patrimônio natural, por exemplo ou ainda os serviços ecossistêmicos que esta biodiversidade nos provê.

Embora os efeitos dos micropoluentes sejam mais notáveis no nível das espécies, seus impactos também podem ocorrer em outros níveis da biodiversidade. Particularmente, a variabilidade genética é considerada o nível mais básico de diversidade biológica e um pré-requisito para a variabilidade de populações, espécies e ecossistemas (PRIMACK, 2014).

8.1 Níveis de diversidade biológica

Inicialmente a diversidade biológica era tida como o número de espécies que ocorria em determinado local ou ambiente. Contudo, com o avanço das pesquisas, outros componentes inerentes a diversidade foram sendo reconhecidos e incorporados, tais como a abundância das espécies e as interações ecológicas, por exemplo (WHITTAKER 1960, 1972).

Neste contexto, a convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), realizada pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 1992 (Eco-92), definiu diversidade biológica como sendo *“a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro das espécies, entre espécies e de ecossistemas”* (Dias, 2000). A diversidade dentro das espécies aqui apresentada deve ser entendida como toda a variação existente entre indivíduos de uma população e entre populações de uma mesma espécie a qual pode ser designada como diversidade genética. Assim, a diversidade genética foi oficialmente reconhecida como uma forma de biodiversidade que engloba toda variabilidade encontrada dentro de cada espécie (BEGON et al., 2006, MAGURRAN, 2010).

Desta forma, o estudo da diversidade biológica se expandiu, sendo considerados diferentes aspectos de sua complexidade. A Figura 2 mostra, de maneira esquemática, os diferentes níveis de diversidade biológica. Assim, um ecólogo tradicional, pode estudar a diversidade biológica focando desde as populações de uma determinada espécie até as intrincadas interações existentes no nível do ecossistema. Da mesma forma, com o avanço das técnicas moleculares e o reconhecimento do nível genético/molecular da biodiversidade, um ecólogo molecular pode estudar os níveis mais basais da diversidade biológica, que compreendem a variabilidade de genes e alelos existentes em uma população ou espécie, mas também pode estudar comunidades, ecossistemas e as intrincadas relações ecológicas, utilizando-se de ferramentas moleculares, que acessam informações não possíveis aos métodos tradicionais. Desta forma, cada vez mais, análises integradas, clássicas e moleculares, têm sido aplicadas na tentativa, com sucesso, de compreender melhor a diversidade biológica.

Figura 2 - Esquema simplificado representando os diferentes níveis da diversidade biológica



Neste sentido, estudos que visam analisar e compreender a biodiversidade em seus diferentes níveis e de forma integrada mostram-se promissores para a obtenção de uma

compreensão mais global e completa da biodiversidade.

Este fato se torna relevante se considerarmos que os diferentes níveis da biodiversidade podem responder de forma diferente aos estressores ambientais tanto no tempo como no espaço. Assim, em ambientes impactados, onde as espécies estão submetidas aos diferentes estressores ambientais de forma crônica, espera-se que o primeiro nível de resposta seja o molecular. Neste nível, podem haver, dependendo do estressor, a indução de mutagêneses e/ou alterações histológicas/fisiológicas, até a perda de diversidade genética com ou sem a seleção de variantes mais adaptáveis as novas condições. Tais alterações levam à diminuição do potencial de sobrevivência da espécie podendo acarretar na diminuição da população e alterar as interações ecológicas ali pré-existent. Mantendo-se o estressor, as respostas em nível genético acabam por alterar a dinâmica da comunidade, a qual por sua vez, leva a alterações no ecossistema local. A figura 2, representa, de forma esquemática tais relações. Embora, em alguns casos e dependendo do nível do estressor ambiental, tais alterações podem acometer diferentes níveis de biodiversidade de forma simultânea, em outros, as consequências parecem seguir a escala presente na Figura 3, principalmente, quando os estressores são mais tênues, mas estão presentes de forma contínua (exposição crônica), como é o caso dos micropoluentes. Com isso, o biomonitoramento nos diferentes níveis da biodiversidade podem revelar como cada nível está respondendo ao estressor e a gravidade do impacto. Quanto maior o nível da biodiversidade afetado, maior o impacto e mais complexa e difícil sua recuperação.

Figura 3 - Esquema simplificado representando a sequência hipotética dos efeitos dos estressores ambientais nos diferentes níveis da diversidade biológica.



J.C

Colocado isso, são apresentados, na sequência, os diferentes níveis e subníveis da diversidade biológica que farão parte do escopo de análise do presente projeto. Optou-se por apresentar a sequência do maior para o menor nível, pois os primeiros são os mais clássicos e amplamente aplicados em estudos de biodiversidade e biomonitoramento.

8.1.1 Ecologia de comunidades – Análises clássica e por DNA ambiental (eDNA)

A ecologia de comunidades visa compreender os mecanismos que determinam os padrões de distribuição das espécies, suas abundâncias e suas diversas possibilidades de interação (FIELD et al. 2009, LOGUE et al. 2011). Tais padrões podem variar conforme a escala espacial, sugerindo que diferentes princípios podem ser aplicados a diferentes escalas (LEIBOLD et al. 2004). Em escala local, geralmente os fatores ambientais (por exemplo, pH, velocidade de correnteza, etc) são os principais fatores estruturadores das comunidades. Entretanto, à medida que aumentamos a escala de estudo as variáveis ambientais locais já não são suficientes para explicar a distribuição das espécies, pois os organismos estão sujeitos a alterações na paisagem e aos processos de dispersão (SOININEN 2007, PERES-NETO & LEGENDRE 2010). Tais efeitos espaciais podem ser acessados utilizando-se informações sobre o uso e ocupação do solo na bacia de drenagem e através de coordenadas geográficas, que atuam como proxies de dispersão das espécies (BARTOZEK et al. 2019).

Outro tema importante em ecologia de comunidades é compreender a diversidade de espécies e sua organização no espaço, através dos níveis alfa, beta e gama de diversidade em comunidades naturais (WHITTAKER 1960, 1972). Para isso, dentro de uma abordagem clássica são amostrados os fatores bióticos (indivíduos, espécies) e abióticos (variáveis físico-químicas, estruturais, da paisagem, etc) em cada ambiente ou local de estudo os quais compõem o banco de dados para as análises acima citadas.

Por outro lado, com o avanço das técnicas de biologia molecular, tem surgido uma gama de ferramentas altamente interessantes para os estudos de biodiversidade, ecologia de comunidades e biomonitoramento. Dentre estas, tem se destacado, nos últimos anos, as técnicas de DNA ambiental (eDNA) associadas ao metabarcoding, comumente chamadas de eDNA metabarcoding. O eDNA se refere a obtenção de fragmentos de DNA a partir da extração de amostras ambientais, como água, solo, fezes, dentre outros, permitindo o acesso a uma gama de informações sem precedentes (VALDEZ-MORENO

et al. 2019). O eDNA se justifica pelo fato de que todos os organismos perdem células a todo momento, ficando esse material, incluindo o DNA, no ambiente pelo qual passou formando um verdadeiro rastro (FICETOLA et al., 2008; BARNES & TURNER, 2016; VALDEZ-MORENO et al. 2019; RUPPERT et al. 2019). Já o metabarcoding se utiliza de técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), as quais permitem amplificar por PCR, com o uso de *primers* universais, e sequenciar milhões de sequências de DNA presentes em uma amostra complexa (por possuir fragmentos de DNA de diversos táxons diferentes) e aplica ferramentas poderosas de bioinformática para identificar, separar e quantificar cada sequência obtida associando-a a um táxon em um banco de dados (RUPPERT et al. 2019).

As vantagens da utilização deste método são inúmeras e suas aplicações extremamente relevantes. Dentre as vantagens, vamos destacar duas: 1. se apresenta como um método não invasivo e que requer menor esforço de coleta (RUPPERT et al. 2019; VALDEZ-MORENO et al. 2019). Os métodos convencionais de estudos em biomonitoramento exigem um extensivo esforço a campo para coleta do material biológico (espécies) com amostragens repetidas ao longo do tempo e do espaço. Tais métodos de amostragens tradicionais exigem coleta ativa, instalação e manuseio de armadilhas e apetrechos de coleta e a amostragem de uma área relativamente extensa, sendo um método completamente invasivo e que pode causar algum tipo de impacto, ainda que pequeno, ao ambiente amostrado (VALDEZ-MORENO et al. 2019; RUPPERT et al. 2019). Por outro lado, o uso do eDNA, exige apenas que se obtenha, com qualidade, uma amostra de água, solo, fezes, etc, na qual existem milhares de fragmentos de DNA das espécies ali presentes, as quais deixam esse material (rastro) no ambiente (FICETOLA et al., 2008; BARNES & TURNER, 2016; VALDEZ-MORENO et al. 2019; RUPPERT et al. 2019). 2. identificação de um grande número de táxons em uma mesma amostra, incluindo espécies raras. Os estudos de ecologia de comunidades e biomonitoramento, utilizando-se os métodos tradicionais, são muitas vezes focados na comunidade de apenas um grupo taxonômico ou poucos grupos, como peixes ou aves, por exemplo, dado que cada grupo possui particularidades nos métodos de coleta que devem ser empregados, exigindo um esforço de coleta elevado, como apontado no item “vantagem 1” (VALDEZ-MORENO et al. 2019; RUPPERT et al. 2019). Além disso, os métodos tradicionais dificilmente amostram a totalidade de espécies ali presentes,

J. L.

principalmente as espécies raras e em pequena abundância (RUPPERT et al. 2019). Por outro lado, em uma amostra bem coletada de eDNA, é possível identificar fragmentos de DNA de quase todas as espécies ali presentes, incluindo as raras, e de vários grupos taxonômicos de forma simultânea, conhecendo assim a composição de toda a comunidade e não restrita à um único grupo taxonômico (VALDEZ-MORENO et al. 2019; RUPPERT et al. 2019).

Na amostra eDNA de um riacho, por exemplo, estão presentes fragmentos de DNA de peixes, algas, macroinvertebrados, bactérias, fungos, anfíbios e de qualquer outro ser vivo que tenha passado por ali. Além disso, o número de sequências associadas a cada táxon permite ainda quantificar sua abundância relativa no ambiente (maior número de indivíduos, maior número de fragmentos de DNA), permitindo-se trabalhar com os diferentes níveis de diversidade em comunidades naturais, alfa, beta e gama (VALDEZ-MORENO et al. 2019; RUPPERT et al. 2019). Desta forma, com uma única amostra de eDNA, obtida de forma não invasiva e com menor esforço amostral, é possível identificar, aplicando-se as técnicas da metabarcoding, toda gama de organismos vivos ali presentes, dos mais variados táxons. Tais vantagens e resultados tem revolucionado os estudos e ecologia de comunidades e biomonitoramento revelando uma gama enorme de informações sem precedentes e tempo quase real alavancando os estudos de biodiversidade, ecologia de comunidades e biomonitoramento (VALDEZ-MORENO et al. 2019; RUPPERT et al. 2019).

8.1.2 Diversidade genética

A diversidade genética aumenta as possibilidades de sobrevivência das espécies, uma vez que facilita as respostas das populações às perturbações ambientais (TEMPLETON, 2011, REDLEY, 2013). Assim, a diversidade genética constitui um elemento importante para as espécies, pois reflete as diferenças adaptativas das populações, sendo que a perda dessa diversidade está normalmente associada com a diminuição das populações, devido, principalmente, ao aumento da endogamia (KELLER & WALLER, 2002, TEMPLETON, 2011). Como consequência, as populações apresentam dificuldades de suportar novos processos de seleção como os ocasionados pelas mudanças climáticas e/ou a contaminação do ambiente, por exemplo

(FRANKHAM et al., 2008, TEMPLETON, 2011). No nível do ecossistema, a perda de diversidade poderia ter efeitos generalizados em seu desenvolvimento e capacidade de recuperação, uma vez que a diversidade genética está intimamente ligada às funções dos ecossistemas (JOHANNESSON & ANDRÉ, 2006; REUSCH et al., 2005). Assim, a perda da diversidade genética contida em populações adaptadas localmente, pode ser tão irreversível quanto a perda de espécies (CARVALHO & IIAUSER, 1994), pois da mesma forma que uma espécie extinta não aparecerá novamente, uma linhagem também não (MORITZ, 2002). De modo geral, a perda ou diminuição de diversidade genética é um dos primeiros indícios de que uma população e/ou espécie possa estar sob ameaça. Assim, estudos que visem identificar os níveis de diversidade genética contidas dentro e entre populações são fundamentais para auxiliar na definição do status de ameaça desses organismos e entender como essas espécies respondem geneticamente às perturbações e alterações ambientais.

Os biomarcadores de diversidade genética ainda podem ser divididos em dois grupos, visando buscar respostas distintas e complementares que refletem o potencial de sobrevivência da população ou espécie. Os marcadores de evolução neutra permitem avaliar os efeitos dos diferentes estressores ambientais nos níveis de diversidade genética das espécies, o qual se correlaciona diretamente ao potencial evolutivo de cada população e em seu potencial de sobrevivência, mostrando o quanto se perde de diversidade genética frente aos estressores analisados (FRANKHAM et al., 2008, TEMPLETON, 2011). Esses dados podem ainda, mostrar eventos de redução populacional ("gargalos de garrafas") que estas espécies/populações sofreram ou estão sofrendo (FRANKHAM et al., 2008, TEMPLETON, 2011). Por outro lado, os marcadores não neutros, ou seja, que estão sob pressão de seleção, permitem avaliar como cada população ou espécie responde aos estressores ambientais no que se refere a sua "adaptação" aos mesmos. Uma vez identificado tais marcadores, estudos de associação, permitem identificar qual ou quais genes estão sob seleção e entender quais os efeitos na fisiologia e/ou biologia das espécies que podem levar a uma adaptação local (FRANKHAM et al., 2008, TEMPLETON, 2011).

Dentro do nível genético de diversidade biológica, podemos trabalhar com diferentes tipos de biomarcadores. Assim, além dos biomarcadores que visam quantificar e avaliar os níveis de diversidade genética contida dentro e entre as diferentes populações, podemos utilizar também marcadores mutagênicos e histológicos. Estes dois últimos, são

96

amplamente empregados em estudos de ecotoxicologia (VALENT, 1998), pois refletem de maneira direta e indireta alterações e/ou contaminantes presentes no ambiente.

8.1.3 Mutagênese

O Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2000) reconhece a insuficiência e ineficácia de respostas diante aos problemas ambientais desencadeados pelos micropoluentes, e em alguns casos, a dificuldade de implantar as ações necessárias para evitar possíveis problemas ambientais. As substâncias tóxicas (micropoluentes) apresentam propriedades persistentes que podem gerar danos ao meio ambiente e aos organismos. Estes contaminantes estão presentes em muitos produtos que são consumidos diariamente, como cosméticos, medicamentos, produtos fitossanitários, alimentos, água e etc. Como o próprio nome sugere são compostos que estão presentes em níveis traço e ultra traço e atualmente pouco se sabe os efeitos destes compostos no ecossistema e para a saúde pública. No Brasil, os testes de ecogenotoxicidade têm sido empregados desde a década de 1980, para avaliações ambientais (VALENT, 1998).

Nos últimos 20 anos, tem sido observado que os testes de toxicidade com organismos aquáticos constituem uma ferramenta efetiva para avaliação dos efeitos de poluentes sobre os organismos vivos. Estes testes possibilitam uma avaliação dos riscos bem como da periculosidade dos agentes químicos, no monitoramento da qualidade da água e no estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes líquidos nos corpos hídricos (ZAGATTO, 1998). O estabelecimento de protocolos de segurança que biomonitorem os ambientes expostos aos agrotóxicos, bem como o desenvolvimento de protocolos mais eficientes e rápidos para uma análise *in loco* sobre as condições ambientais é extremamente necessário.

Análises de genotoxicidade são uma alternativa para execução do biomonitoramento e os bioindicadores de toxicidade, ou de efeitos adversos, que podem ser definidos como: “qualquer resposta biológica, ao nível do indivíduo ou a um nível inferior, a um ambiente químico, que traduz a exposição a esse ambiente”; alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais incluem-se nesta (W.H.O., 1993; CAPELA, 2001). Atualmente uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias xenobióticas nos organismos é o Teste do Micronúcleo (MN). Esse tipo de

teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003). Em estudos realizados por Bucker & Conceição (2004), o Teste do MN foi utilizado para biomonitoramento ecotoxicológico nos Rios Itajaí-Açu e Itajaí-Mirim, no Estado de Santa Catarina-BR. Porto e colaboradores (2005) utilizou o Teste MN, nos peixes da bacia Amazônica, para avaliar a ação mutagênica de altas concentrações de mercúrio.

A utilização dos testes de mutagênese, associados às análises extrínsecas e intrínsecas ecológicas dos ambientes de riachos, possibilitam ter um panorama dos efeitos ecogenotóxicos causados por micropoluentes e outros estressores ambientais. Por conseguinte, é possível desenvolver protocolos de biomonitoramento baseados nas técnicas de mutagênese, tais como o teste do micronúcleo e o ensaio cometa, utilizando as análises genéticas dos eritrócitos e das brânquias como biomarcadores de efeitos da ação genotóxica dos agrotóxicos na água.

8.1.4 Histologia

O uso de diferentes ferramentas de biomonitoramento produzem respostas mais robustas que corroboram entre si, e que podem servir de base para um planejamento mais criterioso das atividades humanas no ambiente.

A contaminação em ecossistemas pode ser monitorada por ações de ecotoxicologia. O termo Ecotoxicologia pode ser definido como o estudo do destino e dos efeitos de substâncias químicas sobre os componentes de um ecossistema, baseado no emprego de métodos de laboratório e de campo (SISISNO & OLIVEIRA, 2013). A biota, principalmente os animais, podem servir de sentinela para explicar o modo de ação que não foi identificado em humanos. Por exemplo, as infecções oportunistas em mamíferos marinhos parecem estar relacionadas à acumulação de bifenilas policloradas, que causam imunossupressão (AZEVEDO & CHASIM, 2004). As avaliações de toxicidade por biomarcadores incluem diversas abordagens de análise: seja em nível molecular, fisiológico, histopatológico ou comportamental. (RODRIGUES, 2016).



Alguns organismos, especificamente, vêm sendo utilizados em testes de ecotoxicidade. A sua escolha, baseia-se em inúmeros parâmetros, como sua representatividade no ecossistema a ser avaliado, sensibilidade, facilidade de cultivo e conhecimento da espécie. Para análise de ambientes aquáticos, são utilizados, principalmente, os peixes, que atuam como bioconcentradores de substâncias presentes em concentrações muito reduzidas na água (OGA *et al.*, 2008). Os peixes são bioindicadores confiáveis devido ao fato de ocuparem diversos níveis tróficos, acumularem contaminantes e refletirem impactos a longo prazo, tendo em conta o tamanho de seu ciclo de vida (JORGENSEN, 2011).

Órgãos como as brânquias e o fígado, por filtrarem e/ou metabolizarem tudo que é ingerido pelos peixes, se tornam órgãos-alvos para avaliar os efeitos dos estressores ambientais. O fígado, por exemplo, devido a sua função no metabolismo de poluentes e sua sensibilidade, tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes, por agentes químicos orgânicos e inorgânicos. Assim, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (HINTON *et al.*, 1992).

Muitos são os motivos que justificam o uso do fígado como órgão indicador do *status* de saúde do peixe e consequentemente do grupo, o que consequentemente reflete como resposta na qualidade do ambiente aquático e apresenta o fígado como um órgão chave no metabolismo e armazenamento de metais. Valon *et al.* (2014) consideram o fígado como o órgão mais importante do corpo realizando inúmeras funções fisiológicas, mesmo não tendo contato direto com os poluentes dissolvidos na água. A Histopatologia é um biomarcador que pode revelar os danos que um xenobiótico pode causar no organismo, tanto no nível celular quanto no tecido, e que frequentemente tem como resultado um provável distúrbio no metabolismo celular (MELA *et al.*, 2013).

As análises histológicas nos fígados podem indicar a ocorrência de lesões histopatológicas que podem alterar ou até comprometer o funcionamento do órgão e assim interferir diretamente em processos fundamentais para a manutenção da homeostase dos peixes. As alterações no tecido hepatócito de peixes descritas sobre efeito de micropoluentes incluem: perda da integridade citoplasmática, perda do limite celular, deformação nuclear, citoplasma vacuolizado, desorganização do tecido e degeneração hidrópica, necrose, núcleos picnóticos, acúmulo lipídico, decréscimo de glicogênio e

inflamação (SILVA, 2004; RICHARDSON *et al.* 2010; ANTUNES, 2013; SILVA, 2015; CECCON, 2016).

Neste contexto, estudos histopatológicos envolvendo órgãos como brânquias e fígado, mostram-se ótimos bioindicadores da presença e dos efeitos dos estressores ambientais no ambiente, configurando uma ferramenta extremamente relevante em estudos de monitoramento da qualidade da água e da saúde dos organismos ali presentes.

8.2 Algas de ambientes lóticos

As algas bentônicas (presas a substratos) constituem os principais produtores primários nos ambientes lóticos, já que neste tipo de ambiente os organismos planctônicos são escassos devido à grande movimentação da água (LAMBERTI, 1996). Entre as algas ocorrentes nesses ambientes, podemos reconhecer dois grupos principais, as macroalgas e microalgas, sendo estas últimas representadas, principalmente, por diatomáceas. As macroalgas têm sido investigadas utilizando-se a definição de Sheath & Cole (1992) que define como “tipicamente, macroalgas de riachos são bentônicas e formam um talo maduro que é uma estrutura discreta e reconhecível a olho nu, a identificação microscópica é geralmente necessária e frequentemente microalgas estão associadas ao talo”. Assim, muitos trabalhos taxonômicos e ecológicos enfocando estas comunidades podem ser encontrados na literatura em várias partes do Brasil e do mundo (PERES *et al.*, 2009; AURICCHIO *et al.*, 2019).

As diatomáceas estão entre as microalgas com maior abundância e riqueza nos ambientes aquáticos (com estimativa de mais de 10 mil espécies atuais). Este grupo de algas vem sendo amplamente utilizadas como bioindicadoras da qualidade da água em várias partes da Europa, América do Norte, Austrália, Ásia e África do Sul (BATE *et al.*, 2004), pois algumas espécies são muito sensíveis às mudanças ambientais, enquanto outras são tolerantes. O uso das diatomáceas também vem sendo incorporado a programas de gerenciamento, a exemplo do WFD - *European Council Water Framework Directive* (European Union, 2000), que visa caracterizar as condições de referência e de qualidade ecológica de grande espectro de ambientes aquáticos buscando, com isto, estabelecer medidas mitigadoras e metas de recuperação (BENNION *et al.*, 2004; SMOL, 2008).

Especificamente sobre o uso de diatomáceas para biomonitoramento no Brasil,

J.L

destacamos o trabalho de Lobo et al. (2016), que visa o uso de diatomáceas epilíticas (aderidas a rochas) para o biomonitoramento dos níveis de eutrofização de riachos subtropicais e temperados. Neste trabalho, os autores utilizam as espécies de diatomáceas para se estimar o Índice Trófico de Qualidade da Água (ITQA), que classifica os riachos em: oligotróficos (poluição desprezível), β -mesosapróbico (poluição moderada), α -mesosapróbico (poluição forte) e eutrófico (poluição excessiva). Vale ressaltar que índices biológicos de qualidade da água devem ser adaptados e calibrados para distintas ecorregiões, uma vez que as preferências e tolerâncias das espécies podem variar espacialmente.

Assim, o estudo dos ambientes aquáticos associando-se análises físicas, químicas e biológicas constitui base consistente para a avaliação ecológica do ambiente, pois permite o conhecimento de condições da água no momento em que são feitas as medições (análises físicas e químicas) e informações de efeitos mais prolongados (análises biológicas), as quais podem refletir estados não mais existentes no momento da verificação (LOBO et al., 2002).

8.3 Macroinvertebrados bentônicos

A comunidade de macroinvertebrados bentônicos de água doce é composta por organismos com tamanho superior a 0,5 mm, portanto, visíveis a olho nu (PÉREZ, 1996). Os organismos bentônicos possuem grande diversidade de espécies, diversas formas e modos de vida, podendo habitar fundos de corredeiras, riachos, rios, lagos e represas. Em geral, se situam numa posição intermediária na cadeia alimentar, tendo como principal alimentação algas e microorganismos, sendo os peixes e outros vertebrados seus principais predadores (ALLAN & CASTILLO, 2007).

Estes organismos desempenham um importante papel na dinâmica de nutrientes, transformando matéria orgânica em energia (CALLISTO & ESTEVES, 1995). Por outro lado, a qualidade do habitat é um dos fatores mais importantes no sucesso e estabelecimento das comunidades biológicas em ambientes lênticos ou lóticos (MARQUES & BARBOSA, 2001). As comunidades de macroinvertebrados bentônicos geralmente se relacionam com variações nas características ambientais dos rios. Tais análises são usadas para gerar e testar hipóteses sobre os possíveis fatores que influenciam

a estrutura da comunidade de rios, e também modelar as respostas da biota às mudanças naturais e antrópicas no ambiente (BARBOUR et al., 1999).

Assim sendo, a utilização dos insetos aquáticos como bioindicadores de qualidade de água representa uma importante ferramenta para indicar a magnitude de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, e ao longo da extensão de toda sua bacia de drenagem.

8.4 Ictiofauna de ambientes lóticos

Os peixes são organismos essenciais nos ambientes lóticos pelo seu efeito nas teias alimentares e pela conexão dos mesohabitats destes ambientes (GILLER & MALMQVIST, 1998). Apesar de ocorrerem nos mais variados ambientes aquáticos, as características peculiares dos ambientes lóticos permitem que, nestes ambientes, a diversidade de peixes seja muito elevada (BÖHLKE et al., 1978; LOWE-MCCONNELL, 1987, 1999; CASTRO, 1999; CASTRO et al., 2003; 2004; 2005).

A ictiofauna de água doce Neotropical é a mais rica de todo o planeta com 6.000 espécies conhecidas (REIS et al. 2003) e 8.000 estimadas (SCHAEFER, 1998). No Brasil são conhecidas aproximadamente 2.600 espécies e inúmeras outras já reconhecidas, porém não descritas (BUCKUP et al., 2007). Porém, este número tende a aumentar, pois as amostragens ainda são insuficientes e muitas áreas permanecem inexploradas (LANGEANI et al., 2007; JUNK, 2007; GALVES, 2009), principalmente aquelas que englobam pequenos riachos e regiões de cabeceira que historicamente foram menos estudados (SCHAEFER, 1998; VARI & MALABARBA, 1998; LANGEANI et al., 2007; CASTRO et al., 2003; 2004; 2005; GALVES et al., 2009). Como exemplo, LANGEANI et al. (2007) realizaram um inventário das espécies de peixes encontradas na bacia do Alto rio Paraná, umas das mais bem estudadas da região Neotropical, e encontraram aproximadamente 50 (15% do total de espécies) espécies novas. Nesse contexto, cada novo levantamento tem apontado a presença de novas espécies, principalmente em ambientes de riachos. Castro et al. (2003; 2004; 2005), em seus estudos, identificaram 6%, 10% e 15% de espécies novas para riachos das bacias dos rios Paranapanema, Grande e Paraná, respectivamente, e Galves et al. (2007) inventariando as espécies do rio Taquara (bacia do rio Tibagi, Paraná), identificaram aproximadamente 10% de novas espécies.

j.l

Por outro lado, a grande diversidade de espécies faz com que este seja o grupo de vertebrados mais ameaçado atualmente (DUDGEON, 2006; IUCN, 2016). A lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção de 2016 publicada pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) aponta 7.967 vertebrados com algum grau de ameaça, dos quais 2.343 são peixes (~30%). A lista brasileira de espécies com algum grau de ameaça de extinção inclui 409 espécies de peixes (portarias MMA nº 444 e 445, de 17 de dezembro de 2014). Porém, estes números são subestimados, pois muitas espécies e/ou regiões não foram analisadas. Dentre as principais ameaças para a ictiofauna e a biodiversidade aquática como um todo estão: a sobre-exploração, a poluição (por defensivos agrícolas e/ou esgoto urbano e industrial), a introdução de espécies exóticas e/ou invasoras, a modificação dos regimes hidrológicos naturais, e a destruição ou degradação dos habitats (DUDGEON, 2006).

Riachos e regiões de cabeceira são habitados principalmente por espécies de peixes de pequeno porte (geralmente menos que 15 cm de comprimento padrão), com distribuições geográficas restritas, pouco ou nenhum valor comercial e muito dependentes da vegetação ripária para alimentação, abrigo e reprodução (BÖHLKE et al., 1978; LOWE-MCCONNELL, 1987; 1999). Espécies de peixes de pequeno porte correspondem a aproximadamente 50% do total de espécies de peixes de água doce descritas da América do Sul e seu tamanho reduzido impede a realização de grandes deslocamentos, tornando as populações isoladas, o que favorece processos de especiação e endemismo (CASTRO, 1999). Por exemplo, comparando os levantamentos ictiofaunísticos realizados por Castro et al. (2003; 2004; 2005) em ambientes de riachos das bacias dos rios Paranapanema, Grande e Paraná no estado de São Paulo verifica-se a existência de 14%, 23% e 7% de espécies exclusivas para cada drenagem, respectivamente. As espécies de peixes que habitam tais ambientes, por serem fortemente dependentes do material orgânico alóctone importado da vegetação marginal para sobreviver (LOWE-MCCONNELL, 1987; 1999; MENEZES et al., 1990; SABINO & CASTRO, 1990; ARAÚJO-LIMA et al., 1995), são fortemente ameaçadas por atividades antrópicas como o desmatamento, a percolação de pesticidas e fertilizantes associados a atividades agrícolas intensivas, a emissão de efluentes e a introdução de espécies exóticas (AGOSTINHO et al., 2005). Assim, a manutenção das características naturais desses ambientes é imprescindível devido à grande dependência das espécies por esses peculiares ecossistemas.

j-l

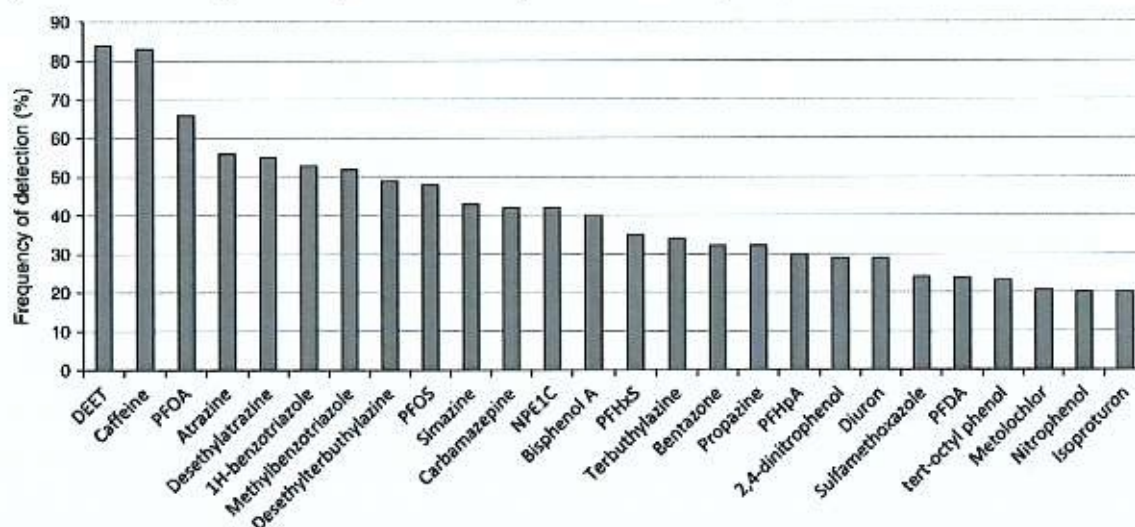
8.5 Determinação de agrotóxicos em águas superficiais

A ocorrência micropoluentes no ambiente se tornou um problema mundial, basicamente em função das inúmeras atividades antrópicas que contribuírem com a contaminação de praticamente todos os compartimentos ambientais (GAVRILESCU et al, 2014; SILVA e COLLINS, 2011; GERÓNIMO et al, 2014). Agrotóxicos, incluindo os de uso proibido, são continuamente detectados em águas superficiais e subterrâneas, além de seus metabólitos que também são biologicamente ativos e podem ser inclusive mais tóxicos que o composto inicial (GAVRILESCU et al, 2014).

O monitoramento ambiental de agrotóxicos é bastante complexo, não apenas em função da complexidade da matriz envolvida, mas também em razão das baixas concentrações apresentadas (frequentemente na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}).

Em uma compilação da presença de micropoluentes em água subterrâneas realizada por Loos et al (2010) a partir de dados obtidos de 23 países europeus, atrazina e seu metabólito desetilatraxina (DEA), simazina, terbutilazina, propazina, bentazona, diuron, metolaclor e isoproturon foram os agrotóxicos de maior frequência identificada em 20% ou mais amostras, entre outros compostos como fármacos, plastificantes e parabenos. A concentração máxima de atrazina quantificada no estudo foi 253 ng L^{-1} enquanto que DEA foi 487 ng L^{-1} .

Figura 4 - Frequência de detecção de micropoluentes em águas subterrâneas a partir do primeiro estudo pan-Europeu realizado por Loos et al (2010)



Fonte: Adaptado de Stuart et al, 2012.

O risco representado pela presença desses poluentes em água subterrânea e, consequentemente, para as águas superficiais é evidente. No Brasil, entre os agrotóxicos monitorados por Nogueira et al (2012) em água superficial e subterrânea na região centro-oeste, atrazina foi detectada em 14% e 11% das amostras coletadas em Campo Verde e Lucas do Rio Verde, respectivamente, em concentrações que variaram entre não detectado (abaixo do limite de detecção da técnica – 200 ng L⁻¹) a 9,3 ng L⁻¹. Outros agrotóxicos e suas concentrações médias foram quantificados nas águas superficiais: α -endosulfam (210 ng L⁻¹), β -endosulfam (90 ng L⁻¹), clorpirifós (10 ng L⁻¹), malathion (20 ng L⁻¹) e metolaclo (70 ng L⁻¹).

Em um estudo desenvolvido por Ronco e colaboradores (2016) na bacia do do Prata na Argentina, apenas 15% das amostras apresentaram quantidades detectáveis de glifosato pelo método utilizado com média de concentração de 0,60 μ g L⁻¹, enquanto que AMPA não foi observado.

Em trabalho desenvolvido na BP3 pelo projeto Micropoluentes fase I, cinquenta e dois agrotóxicos e seis metabólitos foram detectados empregando GC-QTOF MS e LC-QTOF MS (DELLA-FLORA et al, 2019). Em relação a quantificação de atrazina e metabólitos, também desenvolvido no trabalho, atrazina foi detectada abaixo do limite de quantificação em alguns pontos em cinco semanas da primeira campanha amostral (entre janeiro e fevereiro). Na sexta semana concentrações entre 0,26 e 0,81 μ g L⁻¹ foram quantificadas para atrazina e o metabólito DEA foi detectado. Apenas em uma amostra coletada após um episódio de chuva (final de fevereiro de 2017) apresentou concentração superior a regulada pela CONAMA 357/2005 de 2 μ g L⁻¹ sendo quantificado 2,89 μ g L⁻¹ além de DEA e DIA (0,80 e 1,22 μ g L⁻¹, respectivamente).

Com base nesses antecedentes, é possível notar que nem sempre nos locais onde a presença de agrotóxicos foi detectada é possível obter um valor quantitativo devido a habitual incompatibilidade existente entre a concentração das espécies de interesse e a sensibilidade das técnicas instrumentais disponíveis, mesmo com o emprego de métodos de extração e pré-concentração. Com isso, se torna de extrema importância, particularmente quando se objetiva um monitoramento ambiental robustos, rápidos e de baixo consumo de reagentes e solventes, o desenvolvimento de novos métodos de análise de agrotóxicos, quer seja pela introdução de novas técnicas de preparo de amostras quer

J. L.

seja pela evolução instrumental.

8.6 Determinação de agrotóxicos em peixes

O estudo da contaminação difusa devido a presença de agrotóxicos é uma tarefa ampla e difícil pois depende de múltiplas variáveis como persistência, toxicidade, solubilidade dos compostos e das características biológicas, físicas e químicas do meio que se encontram. Além disso, é praticamente impossível prever se existem efeitos sinérgicos quando se tem a presença de vários compostos de forma simultânea em água. Inevitavelmente, organismos aquáticos estão expostos a diferentes agrotóxicos já mundialmente detectados nessa matriz. Portanto, são necessários estudos para entender suas interações da presença de agrotóxicos com o sistema vivo e estabelecer sua avaliação de risco.

A concentração de contaminantes nos peixes pode refletir o estado de poluição do ambiente aquático pois podem acumular tais micropoluentes diretamente da água ou os absorver através da sua dieta (BLOCKSOM et al., 2010; KACZYŃSKI et al, 2017).

Assim, pesticidas podem ser encontrados em órgãos e tecidos biológicos, como fígado de peixe, especialmente em peixes de nível trófico superior (bioacumulação) (BARBUKHO, 2016; CALDAS et al 2013; GUO et al 2008). Devido a tais características, o fígado de peixes pode ser considerado uma matriz adequada para a determinação de agrotóxicos (ASATI et al, 2018; KACZYŃSKI et al, 2017; AGBOHIESSI et al, 2015; BARBUKHO, 2013).

De acordo com estudo realizado por Barbukho (2013) em fígado de peixes do rio Desna e lagos Volzhyn e Cherneche (Ucrânia) o acúmulo de agrotóxicos foi mais intenso na primavera, especialmente em espécies predadoras, para as quais os níveis de agrotóxicos determinados foram: glifosato (1,40–2,06 µg/g), carbendazim (0,34–1,97 µg/g), imidacloprid (0,15–1,90 µg/g), bentazona (0,30–1,61 µg/g) e metribuzina (0,56–1,40 µg/g).

Kaczyński e colaboradores (2017) evidenciaram a presença de agrotóxicos em 11 amostras de músculo e 13 amostras de fígado de peixe entre peixes que pesavam mais de 1 kg. Os agrotóxicos encontrados foram os herbicidas atrazina e metolachlor e inseticidas DDT e lindano, todos com concentração abaixo do limite de resíduo máximo (MRL). Os

J. L.

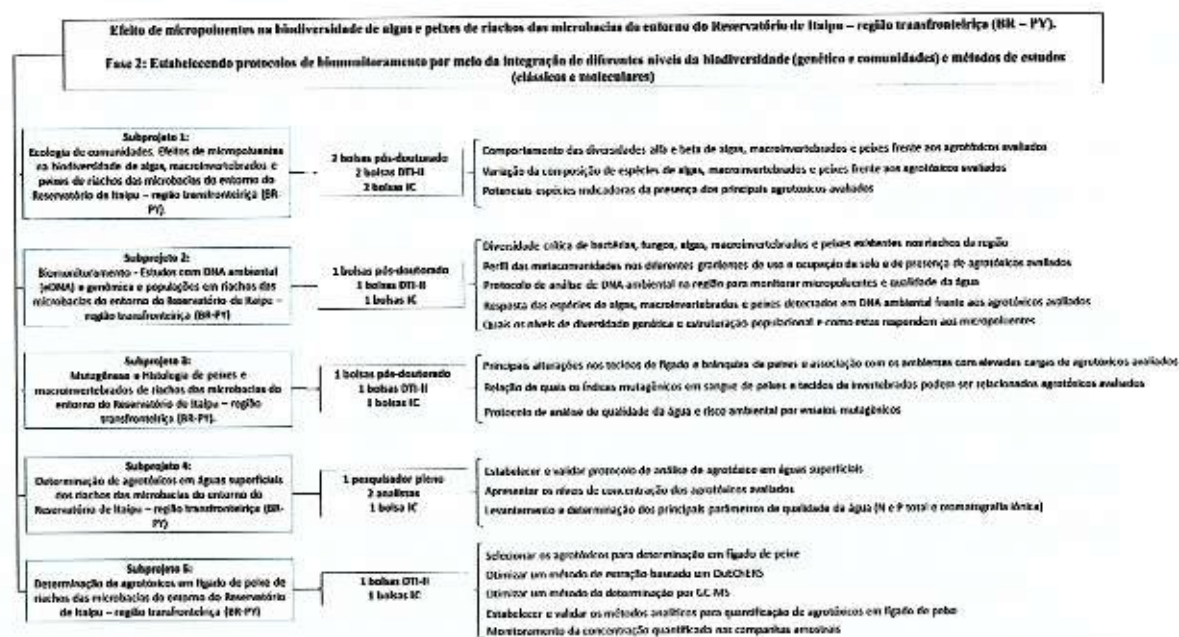
autores ainda comentam que a lipofilicidade é a propriedade físicoquímica com papel fundamental na absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos agrotóxicos. Apesar da atrazina e metolaclor possuírem natureza lipofílica moderada ($\log P$ 2,7 e 3,05, respectivamente) se comparada com DDT (6,91), a baixa solubilidade em água favorece a adsorção por tecido adiposo.

É importante ressaltar que a análise de resíduo de pesticida em peixe é um desafio devido a baixa concentração e ao amplo número de compostos que precisa ser monitorado e quantificado em uma matriz complexa.

9. ESTRUTURA DO PROJETO

O projeto está dividido em 05 subprojetos. Os três primeiros subprojetos estão sob a responsabilidade de um pesquisador professor (a) doutor (a) da UNILA enquanto que os subprojetos 4 e 5 sob responsabilidade do PTI.

Figura 5 - Estrutura dos subprojetos.¹



¹ Diagrama da estrutura do projeto impressa em folha A3 e anexo ao final

10. OBJETIVOS

10.1 Objetivo Geral

O presente projeto é proposto com o objetivo principal de analisar o efeito de micropoluentes sobre a biodiversidade aquática em riachos da região transfronteiriça (Brasil e Paraguai) e buscar protocolos para o biomonitoramento. Para isso serão analisados, de forma integrada, três dos mais importantes componentes da biota de ambientes lóticos. Um destes componentes estará representando os produtores primários e os outros dois sendo representando pelos consumidores sendo, comunidades de algas (diatomáceas e macroalgas), macroinvertebrados bentônicos e de peixes, respectivamente. Diferentes níveis da biodiversidade genética (mutagênese, histologia e diversidade genética) e de comunidades serão avaliados por metodologias clássicas e moleculares em conjunto com os dados obtidos para a presença de micropoluentes em água e fígado de peixes.

10.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos são propostos: 1) contribuir para o conhecimento da biodiversidade de algas, macroinvertebrados e peixes dos ambientes lóticos da região; 2) estimar a quantidade de agrotóxicos selecionados nas amostras de água e fígado de peixe; 3) analisar os possíveis impactos dos micropoluentes na diversidade e composição de espécies; 4) encontrar espécies, potencialmente bioindicadoras da presença de micropoluentes e outras condições ambientais; 5) obter os dados de diversidade genética e buscar correlacioná-los com os micropoluentes; 6) obter dados de DNA ambiental e buscar implementar um protocolo de análise para a região.

11. METODOLOGIA

11.1 Detalhamento da proposta

De forma mais detalhada e baseando-se nos resultados promissores da fase 1 do projeto (2018-2020) pretende-se:

Amostrar mais um ciclo anual (coletas nas três principais fases do calendário



agrícola regional) nos 24 pontos de amostragem já definidos, compreendendo 12 no Brasil e 12 no Paraguai.

O problema principal a ser investigado será a relação entre mudança na paisagem e a concentração de Atrazina (e seus derivados) e Glifosato ocorrentes na água, e demais micropoluentes que serão quantificados a partir dos resultados da análise de *screening* da fase 1 do projeto, e que estiverem disponíveis neste novo ciclo (dados que serão obtidos com a equipe de químicos do projeto). Os limites de quantificação obtidos pelo desenvolvimento dos métodos serão os menores permitidos pelo preparo de amostra e técnica instrumental selecionada, com garantia de valores com exatidão e precisão adequados para tais níveis de concentração.

Será abordada essa problemática através de variáveis resposta de múltiplos níveis da biodiversidade nos três principais grupos de organismos aquáticos de ambientes lóticos: Algas perifíticas (diatomáceas e macroalgas), Macroinvertebrados bentônicos e Peixes. Para tanto serão avaliados três eixos correspondentes aos diferentes níveis e subníveis da biodiversidade propostos:

1-No eixo da ecologia de comunidades, será avaliada a relação da concentração desses micropoluentes com as diversidades alfa (aumento ou diminuição de espécies e ocorrência de extinções locais), composição de espécies (presença de espécies indicadoras ou dominância de espécies tolerantes) e diversidade beta (perda ou não de heterogeneidade entre comunidades). Para isso serão aplicadas duas abordagens: uma clássica, que visa a coleta e identificação dos organismos *in loco* (permitindo também a obtenção de índices de diversidade funcional) e outra molecular, com a aplicação da técnica do *eDNA metabarcoding*, que representa uma técnica não invasiva e com potencial de identificação de espécies raras e da totalidade da comunidade como apresentado no tópico respectivo na introdução. Serão utilizados marcadores universais para a identificação de algas (um ou alguns grupos), macroinvertebrados (principalmente dos grupos EPT- Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera), peixes, além de bactérias e fungos cujas comunidades podem refletir grupos funcionais presentes no ambiente. Como resultados potenciais, poderemos compreender os efeitos desses poluentes e das mudanças ambientais na paisagem e na diversidade desses grupos e até chegar a apresentar potenciais bioindicadores da presença desses poluentes para uso no gerenciamento ambiental desses corpos hídricos;

2-No eixo da diversidade genética (ecologia/genômica de populações/evolução), serão avaliados em grupos de algas, macroinvertebrados e peixes as modificações genéticas relacionadas com esses micropoluentes. Para isso serão empregados dois tipos de marcadores: A - os de evolução neutra, que permitem avaliar os efeitos de todas essas variáveis na diversidade genética das espécies, refletindo diretamente no potencial evolutivo de cada população e em seu potencial de sobrevivência, mostrando o quanto se perde de diversidade genética frente aos estressores analisados; B - marcadores não neutros, ou seja, sob pressão de seleção, com o objetivo de avaliar como cada espécie responde a esses estressores e se "adaptam" aos mesmos. Neste contexto, em comparação com a fase 1 do projeto, iremos estender a análise para os outros 2 grupos de organismos (algas e macroinvertebrados) para traçar esses mesmos efeitos nos diferentes níveis tróficos. No caso dos peixes, será aplicada a abordagem por genômica de populações, acrescentando-se mais uma espécie com biologia diferente (temos uma piscívora e uma herbívora, ambas de fundo; será analisada agora uma onívora/oportunista (lambari) de coluna d'água); e para os outros dois grupos (pelo menos um macroinvertebrado e uma espécie de alga), serão aplicados apenas os marcadores moleculares neutros e de forma mais simples, para traçar um perfil inicial das respostas nesses grupos, mas que fornecem dados suficientes para correlacionar os três grupos taxonômicos.

3- No eixo ecotoxicológico (histologia e mutagênese), buscaremos reportar os possíveis efeitos tóxicos relacionados à presença destes micropoluentes, por meio da continuidade do estudo do fígado e das brânquias dos peixes coletados. Para tanto, seriam incluídas as análises histoquímicas para glicogênio nas duas espécies que já estão sendo estudadas (fase 1) e seria acrescida ainda uma terceira espécie (lambari), para a qual serão aplicadas as análises histológicas de fígado e brânquias, como também a análise histoquímica do glicogênio no fígado. Desta forma, teremos dados de três espécies com hábitos diferentes, sendo uma herbívora/pastadora de fundo (casado *Ancistrus*), uma carnívora/piscívora de fundo (bagre *Heptapterus*) e uma onívora/oportunista de coluna d'água (um lambari). No caso da mutagênese, como para os marcadores genéticos, a análise será expandida para os outros dois grupos biológicos para correlacionar os dados. Serão analisados os efeitos (testes de micronúcleo e cometa) na espécie de peixe que será incluída e será desenvolvido um protocolo de teste cometa para, pelo menos, uma espécie de macroinvertebrado aquático.

O foco maior nos níveis iniciais de biodiversidade (mutagênese, histologia e molecular), se dá pelo fato de que os efeitos podem demorar para aparecer nos níveis ecológicos mais altos (embora sejam cumulativos). Desta forma, nesses níveis basais podemos identificar potenciais riscos ao ambiente, suas espécies e até mesmo para a nossa espécie, em estágios mais iniciais e com grande potencial de tempo para a aplicação de medidas de recuperação/preservação. Quando os efeitos aparecem nos níveis mais altos, em geral, significa que os danos já estão em um estágio avançado e, muitas vezes, de forma irreversível ou de difícil remediação.

Ainda, a determinação de agrotóxicos em fígado de peixe, de competência do PTI em colaboração com a UNILA, além de verificar a possível bioacumulação nos ambientes de riacho, os valores contribuirão para explicar a menor taxa de quantificação dos agroquímicos selecionados em água, apesar da sua identificação como suspeitos (*screening*). O fígado é um órgão considerado crucial para o metabolismo de nutrientes e desintoxicação de substâncias nocivas sendo considerado ótimo indicador para o acúmulo de compostos lipofílicos. Além disso, as modificações funcionais estruturais e histológicas investigadas poderão ser segregadas quanto a presença de agrotóxicos e possível efeito causado por estes, ou ausência de agrotóxicos e efeito da paisagem.

11.2 Área de estudo

A região transfronteiriça (Brasil/Paraguai) próxima ao reservatório de Itaipu pertence à Ecorregião Florestas do Alto Paraná que, por sua vez, está incluída no Complexo Mata Atlântica (Di Bitetti et al., 2003). A topografia da região varia desde áreas relativamente planas, com solos profundos, próximas ao rio Paraná e a outros rios principais, em altitudes entre 150 e 250 m acima do nível do mar (anm), a planaltos relativamente planos, com altitudes entre 550 e 800 m anm. As áreas localizadas entre os rios principais e o planalto, em altitudes entre 300 e 600 m anm, têm escarpas relativamente íngremes e são extremamente expostas à erosão do solo quando a cobertura florestal é removida (LIGIER, 2000). Os solos da região são relativamente ricos em nutrientes. São geralmente profundos e de cor avermelhada, quando próximos aos rios principais, tornando-se menos profundos e mais pedregosos em maiores altitudes. Existe grande variação de tipos de solos, com alteração da textura, composição química e acidez (LIGIER, 2000). A precipitação fica na faixa de 1.000 a 2.200 mm por ano, mas nos anos em que ocorre o fenômeno do El Niño, o mesmo ocasiona grandes variações na

precipitação anual.

A vegetação natural da região é caracterizada pela floresta estacional semidecídua (Domínio Mata Atlântica). O conceito ecológico deste tipo de vegetação está condicionado pela dupla sazonalidade climática, que nesta região está ligada com a seca fisiológica provocada pelo intenso frio do inverno, com temperaturas médias inferiores a 15°C. Neste tipo de vegetação a porcentagem das caducifólias, no conjunto florestal situa-se entre 20 e 50% (IBGE, 1992). Porém, as variações locais no ambiente e no tipo de solo permitem a ocorrência de outras comunidades de plantas como florestas de galeria, bambusais e palmitais. Entretanto, a maior parte da vegetação natural na região está degradada e tem sido substituída principalmente pelos sistemas agrícolas. Tais impactos têm colocado em risco eminente a preservação e manutenção de sua biodiversidade, ainda pouco conhecida, bem como a bacia como um todo do ponto de vista hídrico, ambos os quais, patrimônios imensuráveis da humanidade.

11.3 Métodos de amostragem

Serão amostrados os 24 pontos já definidos no escopo do projeto micropoluentes e de acordo com as categorias a, b e c já definidas.

Em cada riacho será demarcado um trecho de aproximadamente 50 metros onde serão conduzidas as amostragens do material biológico. As amostragens dos organismos serão conduzidas sempre em períodos de precipitação regular.

As macroalgas serão amostradas seguindo a técnica da transeção (Sheath & Cole, 1992), onde o material será coletado através de observação visual com a ajuda de um balde com fundo de vidro para melhorar a observação (e.g. Sheath & Cole, 1992; Hu & Xie, 2006; Peres, 2011). O material biológico coletado será acondicionado em frascos e fixado em formaldeído 4%, posteriormente será levado para o laboratório onde será armazenado.

Para amostragem das diatomáceas, de cinco a 10 pedras arredondadas serão amostradas de modo a compor a heterogeneidade de cada estação amostral. As diatomáceas serão raspadas das pedras com auxílio de escovas de dente e fixadas com lugol 5% e formaldeído 4%.

Para a coleta de macroinvertebrados bentônicos será utilizado um coletor do tipo “hand net” (30x30cm), com malha de 500 µm. Serão subamostrados 10 microhabitats,

com aproximadamente 1m² cada um, totalizando uma área de 10m² por trecho de rio, buscando amostrar os principais substratos disponíveis para a fauna aquática (cascalho, folhas, gravetos, sedimentos finos, etc.) (Barbour et al., 1999). Todas as subamostras serão agrupadas em uma única amostra composta, representando cada localidade.

A coleta dos peixes ocorrerá no sentido jusante-montante utilizando a combinação de diversos métodos de captura como puçás, redes de arrasto e equipamento de pesca elétrica, visando amostrar a totalidade da ictiofauna de cada ponto de coleta. Os exemplares coletados serão fixados em etanol 96%. Cinco exemplares de cada espécie terão material biológico retirado (nadadeira ou músculo), o qual será identificado e preservado em etanol absoluto e acondicionados em freezer -20°C para a montagem de um banco de tecidos que ficará disponível para as análises moleculares.

Pra as análises de *eDNA metabarcoding* serão coletadas amostras de água e sedimento em diferentes pontos do trecho previamente definido, as quais irão formar uma amostra composta. As amostras serão filtradas para concentração dos fragmentos de DNA para posterior extração.

Serão amostradas variáveis ambientais consideradas importantes para esses organismos como: pH, condutividade elétrica, turbidez, velocidade da correnteza, profundidade, etc. Todas essas variáveis serão analisadas de acordo com métodos e técnicas reconhecidas e utilizadas em importantes publicações da área.

11.4 Determinação de agrotóxicos em água

Os métodos de determinação de agrotóxicos em água serão desenvolvidos no âmbito do projeto Micropoluentes II (Subprojeto 1). Os analitos serão selecionados a partir da compilação dos resultados qualitativos obtidos pelo screening das amostras realizado entre 2019 e 2020.

Para as análises de atrazina e metabólitos o método já está implementado no laboratório: a extração é realizada com emprego de cartuchos SPE Oasis® (200mg, 3 mL), condicionado com 5,0 mL de uma solução diclorometano: metanol (1:1) e 5, mL de água deionizada. 200 mL de amostra de água são percolados. O cartucho é seco sob vácuo e fluxo de nitrogênio. A eluição é seguida com 5,0 mL de diclorometano: metanol (1:1) e o extrato seco completamente sob fluxo de nitrogênio. A reconstituição é feita com 200 µL de diclorometano e adição de padrão interno de trifenilfosfato (50 µg L⁻¹). A análise

cromatográfica é realizada no cromatógrafo gasoso GC-MS TRACE 1300 (ThermoScientific) com coluna capilar TR-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), também da ThermoScientific.

Para atingir maior probabilidade de quantificação de glifosato e AMPA, a detectabilidade do método atual realizado por cromatografia iônica deverá ser melhorada. A melhor alternativa para esse caso é empregar outra técnica cromatográfica como a cromatografia líquida com detecção por fluorescência e a etapa de derivatização das amostras. O método poderá ser adaptado daqueles já desenvolvidos pelas bolsistas do projeto Micropoluentes II, para a realidade das amostras e equipamentos disponíveis.

Outros agrotóxicos de interesse, selecionados a partir do screening, como metolaclor, imidacloprid, tiametoxan, fipronil, azoxistrobina, entre outros, terão seus métodos ainda desenvolvidos. O maior número de agrotóxicos passíveis de determinação por um mesmo método será investigado, e os limites de quantificação a ser atingidos serão os menos permitidos pela técnica de análise utilizada.

Acompanhado da determinação de agrotóxicos em água, a equipe do PTI com colaboração com a UNILA ficará também responsável pelas análises de alguns parâmetros da qualidade da água como determinação de ânions (fluoreto, cloreto, brometo, nitrito, nitrato, sulfato e fosfato) e cátions (lítio, sódio, potássio, amônio, cálcio e magnésio) empregando um cromatógrafo iônico da Itaipu (930 Compact Flex Metrohm) bem como nitrogênio e fósforo total obtidos pelo método Valderrama.

11.5 Determinação de agrotóxicos em fígado de peixe

As amostras de fígado de peixe serão obtidas de exemplares de cada uma das três espécies a serem coletadas (cascudo *Ancistrus*, bagre *Heptapterus* e lambari). Após congelamento a -20 °C, as amostras de fígado serão liofilizadas em liofilizador de bancada Christ (Alpha 1-2 LD Plus) por um período de 72h ou até verificação de completa ausência de água. Isto permite um armazenamento de longo prazo de amostras secas, sem causar uma mudança de estado ou perda de propriedades químicas.

Para a determinação de agrotóxicos em fígado de peixe, a extração será investigada utilizando o método QuEChERS, desenvolvido por Anastassiades et al. (2003) para a determinação de agrotóxicos em alimentos. O método será modificado e adequado para as condições e matriz de interesse. Para tanto, 0,25 a 0,50 g de amostras de fígado

de peixe serão transferidas para um tubo falcon de 15 mL, com adição de padrão interno (atrazina deuterada ou trifenilfosfato) e volume a ser otimizado de acetonitrila. Após agitação manual, a etapa de extração em fase sólida dispersiva será realizada com quantidade conveniente de etilenodiamino-n-propilsilano (PSA) e sulfato de magnésio. Além das quantidades, serão avaliadas o emprego de diferentes fases sorventes bem como extração na presença ou ausência de água e soluções tampão. Outros métodos de extração alternativos poderão ser investigados como dispersão de fase sólida na matriz (MSPD) (CALDAS et al, 2013) ou ainda com auxílio de ultrassom.

É importante ressaltar que os dados obtidos para screening utilizaram um equipamento do tipo UIPLC-QTOF MS que fornece resposta quanto a analitos mais polares. O equipamento disponível para realizar análises com mais seletividade é um GC-MS que possui como característica principal a análise de compostos pouco polares e voláteis. Diante disso, podem haver algumas limitações quanto aos agrotóxicos inicialmente identificados pela primeira técnica quando não se tem um equipamento compatível. A princípio, o maior número de agrotóxicos disponíveis será investigado.

11.6 Análise de dados

11.6.1 Identificação das espécies

No laboratório, os espécimes de algas, macroinvertebrados e peixes serão analisados e identificados com um microscópio/ estereomicroscópio no menor nível taxonômico possível, utilizando-se de literaturas especializadas de cada grupo.

Para análise das diatomáceas, o material orgânico será removido através do método de oxidação de Moreira-Filho & Valente-Moreira (1981) utilizando-se permanganato de potássio e ácido clorídrico, de modo a permanecer apenas as frústulas (parede celular) das diatomáceas. Lâminas permanentes serão montadas utilizando-se Naphrax® como meio de inclusão (IR = 1,73). O estudo taxonômico será baseado em análise populacional, registrando a variabilidade morfológica dos táxons. A análise será realizada ao microscópio óptico sempre em aumento de 1000x. Os táxons serão identificados em nível específico e infraespecífico, sempre que possível. A análise quantitativa será realizada conforme Battarbee et al. (2001), com contagem dos indivíduos em transeções longitudinais nas lâminas permanentes. O limite de contagem será determinado pela combinação de dois critérios: número mínimo de 400 valvas em

cada amostra e eficiência de contagem mínima de 90% (PAPPAS & STOERMER, 1996), padronizando, assim, o esforço de quantificação e permitindo a comparação entre as comunidades. Os dados quantitativos serão expressos em abundância relativa (%), conforme recomendado e adotado na grande maioria dos estudos ecológicos sobre diatomáceas.

11.6.2 eDNA metabarcoding

O eDNA será extraído de acordo com protocolos disponíveis na literatura e que serão testados e adaptados, se necessário, as nossas condições. Após a extração os fragmentos de DNA serão amplificados por PCR com o uso de primers universais para cada grupo alvo e os produtos de amplificação serão enviados a empresa prestadora de serviços que procederá a técnica sequenciamento com uso de sequenciadores de nova geração (NGS) e o processamento inicial dos dados com ferramentas adequadas de bioinformática. Os dados brutos serão retornados e se seguirá as análises de ecologia de comunidades, por meio de pacotes disponíveis no software R, além de outros específicos para área

11.6.3 Diversidade genética

Para a obtenção dos dados de diversidade genética, para a espécie de peixe selecionada será aplicada a técnica de genômica de populações. Para isso, serão selecionados de cinco a oito indivíduos, os quais terão do DNA total extraído com uso de kits comerciais. O DNA extraído será quantificado e preparado para envio à empresa prestadora de serviços a qual procederá a obtenção e triagem de SNPs. Para as espécies de macroinvertebrados e alga selecionada, o DNA total será extraído com o uso de kits comerciais. Será amplificado, por PCR, um fragmento parcial de DNA comumente utilizados em estudos de populações para grupo e que estão disponíveis na literatura. Com os marcadores genéticos disponíveis (SNPs ou sequência de DNA) serão obtidos os índices riqueza alélica e heterozigosidade. Serão obtidos também os índices de estruturação e diferenciação populacional (análise de variância molecular, índices de fixação interpopulacionais (F_{ST} e R_{ST}) e fluxo gênico) para a comparação entre as populações. O programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER et al. 2005) será utilizado para as estimativas de variabilidade genética (riqueza alélica e heterozigosidade) e de estrutura

jil

populacional (análise de variância molecular, índices de fixação interpopulacionais (F_{ST} e R_{ST}) e fluxo gênico).

11.6.4 Mutagênese

11.6.4.1 *Teste do Micronúcleo Eritrócitos Policromáticos Písceo (MN)*

Para análise dos micronúcleos (MN) será empregada a técnica descrita por Heddle (1973), com algumas modificações. Imediatamente após se coletar o sangue do peixe, utilizando capilares heparinizados, aproximadamente 5 μ L de sangue será pingado em uma lâmina de vidro limpa. Em seguida com o auxílio de uma lâmina será realizado um esfregaço. As lâminas serão secas a temperatura ambiente por um período de no mínimo 20 minutos. Transcorrido esse período, procede-se a fixação do material, com imersão das lâminas em Metanol por 20 minutos.

Antecedendo a análise microscópica, as lâminas serão coradas com Giemsa 5% (MERCK) diluída em água destilada, por 8 minutos. Transcorrido este tempo as lâminas serão lavadas suavemente com água destilada para a retirada do excesso de Giemsa e deixadas a temperatura ambiente para secar. Após a secagem as lâminas serão analisadas ou acondicionadas em caixas próprias, para serem analisadas posteriormente.

Para o Teste de Micronúcleos, serão contabilizados 1.000 eritrócitos policromáticos. Todas as células que apresentarem micronúcleos e/ou alterações morfológicas nucleares serão contabilizadas.

11.6.4.2 *Análises de Eritrócitos com Laranja de Acridina (LA)*

Estas análises serão realizadas segundo a técnica descrita por Ueda et al. (1992) com pequenas alterações. O sangue coletado será mantido em tubo eppendorf. Serão retirados 20 μ L e colocados sobre a mesma quantidade de soro bovino fetal previamente colocado em uma lâmina de microscopia. Com o auxílio de uma micropipeta o conteúdo total será gentilmente aspirado e retornado a lâmina por uma melhor homogenização. Será realizado um esfregaço do material com o auxílio de uma lamínula. O material será seco a temperatura ambiente por 12h. Posteriormente estas lâminas serão fixadas com Metanol por 10 minutos. A coloração será feita com uma solução de LA a 0,003% em tampão Sorensen's pH 6,8. A análise será feita imediatamente, uma vez que estas lâminas não podem ser estocadas por muito tempo em função da perda de fluorescência da LA. Serão

computadas 1000 células de cada lâmina anotando-se o número de eritrócitos jovens (policromáticos) com e sem micronúcleos e o de eritrócitos maduros (normocromáticos) com e sem micronúcleos.

11.6.4.3 Ensaio cometa em Eritrócitos Policromáticos

O ensaio cometa será realizado de acordo com Singh e colaboradores. (1988), com algumas modificações. Amostras de eritrócitos policromáticos do sangue serão coletadas. Para a coleta se utilizará capilares heparinizados e 25ul de sangue serão adicionados em tubos cônicos contendo 2ul de heparina e 50ul de Soro fetal bovino (SFB). Para as análises dos cometas dos eritrócitos, 5ul da mistura (50ul SFB, 2ul heparina e 25ul de sangue) serão utilizados. Para realização da técnica de ensaio cometa, lâminas de vidro 26 x 76mm Knittel® (GlasbearbeitungsGmbH, Alemanha) serão imersas em solução de agarose NMP (Normal Melting Point) Top Vision™ (Fermentas, Vilnius, Lituânia) a 1,5%, diluída em tampão PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} a 60°C, formando, assim, uma película de agarose e mantidas overnight. Cinco microlitros do material (mistura de eritrócitos) serão coletados e misturados a 250µL de agarose LMP (LowMelting Point) Top Vision™ (Fermentas, Vilnius, Lituânia) a 0,8% diluída em PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} a 37°C. O volume de 85µL será transferido para a lâmina pré-coberta com agarose NMP 1,5%. As lâminas com o material serão cobertas com uma lamínula e mantida a 4°C por 20 minutos. Após este tempo, a lamínula será retirada e a lâmina submersa em solução de lise (NaCl 2,5M; EDTA 100mM; Tris-HCl 10mM) por 1 hora. Essa solução remove o citoplasma e proteínas nucleares e, para evitar danos no DNA, o procedimento será executado no escuro (Collins 2001). Após a lise, as lâminas serão lavadas em PBS, dispostas em um equipamento horizontal de eletroforese contendo uma solução tampão (NaOH e EDTA, PII > 13,0) e incubadas a 4°C por 40 minutos nesta solução.

Após o período de incubação, será realizada uma corrida eletroforética a 4°C, em uma corrente de 25V e 300mA por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas serão colocadas em um borel e submersas em uma solução neutralizadora (400mM, Tris-HCl pII 7,5). Em seguida, serão lavadas em água destilada por três vezes em intervalos de 5 minutos e fixadas em álcool 100%. As lâminas serão acondicionadas em geladeira até serem coradas com 20µL de Iodeto de Propídeo (PI a 4µg/µL) e visualizadas em microscópio de fluorescência Carl ZeissAxioScope. Os nucleóides serão analisados com

aumento de 400X. Serão analisados 100 nucleóides por lâmina, os quais serão classificados como 0 (sem danos), 1 (dano mínimo) ou 2 (dano máximo) de acordo com o tamanho da calda. O número de nucleóides observados por classe será multiplicado pelo valor da classe, obtendo-se assim o score do cometa. As análises estatísticas serão baseadas no valor dos scores gerado.

11.6.4.4 Análise Estatística

Será realizada análise estatística para verificação do nível clastogênico associado ao efeito genotóxico causado pelos micropoluentes. Os resultados serão analisados utilizando os testes de variância não paramétricos para amostras independentes, Teste de Kruskal-Wallis e o teste de variância paramétrico, ANOVA, para amostras pareadas, base Teste-T-Student. O nível de significância limite para inferir diferenças estatísticas será de 5% ($p < 0,05$). Para tanto, será utilizado o software BioEstat versão 5.0 e software Instatplus + v3.36.

11.6.5 Histologia

Serão obtidas amostras de brânquias e fígado para até cinco exemplares de cada uma das três espécies a serem analisadas, por ponto de coleta. Os tecidos serão submetidos a protocolos padrões de fixação, emblocamento de historesina, corte em micrótomo e coloração para montagem das Lâminas histológicas.

Para cada amostra de fígado e brânquia, uma lâmina será analisada com a escolha aleatória de cinco cortes e para cada corte a escolha também aleatória de uma área de aproximadamente $10.000 \mu\text{m}^2$. Todo o processo de análise das lâminas se dará às cegas, onde não serão identificados o local de origem (pontos de coleta) das amostras, evitando-se assim um viés tendencioso na análise.

Para a análise das imagens será utilizado o equipamento de microscopia de luz marca Zeiss – modelo: PrimoTech, com câmera AXION Cam – Zeiss, utilizando-se nas imagens a objetiva 50X e 100X.

Para avaliar os danos nos tecidos, serão utilizados índices histopatológicos, em que se aplicam fórmulas matemáticas, permitindo assim uma avaliação numérica e comparação de diferentes estudos (ZENI, *et al.*, 2016). Para isso, será adotada, inicialmente a metodologia proposta por Bernet, *et al.* (1999), a qual baseia-se na

extensão e relevância patológica da alteração. Esta metodologia classifica as alterações em cinco “Padrões de Reação”: Distúrbios Circulatórios; Mudanças Regressivas; Mudanças Progressivas; Inflamações e Tumores. Para cada alteração encontrada é atribuído um valor conforme seu valor de importância (1: leve; 2: moderado e 3: marcado) e um valor de ocorrência conforme a extensão (score de 0 a 8).

Posteriormente os resultados serão submetidos a testes estatísticos adequados para se verificar a significância das alterações encontradas comparando-se os diferentes grupos de tratamento.

11.6.6 Análises ecológicas e integradas

Todas as análises ecológicas serão realizadas no o software R v.3.6.1 (R Core Team, 2019). O R é um software livre e gratuito que utiliza linguagem de programação semelhante a C++. Utilizaremos diversas análises exploratórias para visualizar as características e distribuição dos dados amostrados, encontrar possíveis outliers e testar a presença de multicolinearidade entre as variáveis (e.g., análise de normalidade, homocedasticidade, fator de inflação da variância, correlogramas e box plot).

Para as análises ecológicas, os dados bióticos de peixes, macroinvertebrados e algas serão analisados em função de seus valores de diversidade alfa, diversidade beta e composição das espécies. A diversidade alfa será considerada como a riqueza específica, i.e. o número de táxons por unidade amostral (MAGURRAN, 2013). A diversidade beta será estimada a partir da variância total da composição da comunidade utilizando uma matriz com as abundâncias relativas das espécies transformadas pelo método Hellinger (LEGENDRE & DE CÁCERES 2013). Assim, será estimada a diversidade beta total e para cada conjunto de riachos definidos. Posteriormente, a diversidade beta será particionada em seus componentes substituição de espécies (turnover) e aninhamento (nestedness) de modo a identificar suas contribuições relativas para a diversidade beta (LEGENDRE 2014). A composição das espécies será analisada com a ordenação nMDS (Escalonamento Multidimensional Não-Métrico) (CLARKE & WARWICK 1994). Além disso, será utilizada uma análise de partição da variância para identificar a contribuição relativa dos preditores ambientais e espaciais na estruturação de cada assembleia.

Além das análises dentro de cada grupo de organismos, faremos uma análise integrando os grupos para testar o efeito de variáveis da paisagem, qualidade da água e

estrutura dos riachos sobre a biodiversidade de algas, peixes e macroinvertebrados. Para tanto, utilizaremos a análise chamada de 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). Em resumo, a SEM incorpora diferentes modelos à análise de rotas, permitindo avaliar a influência de múltiplas variáveis em uma única rede de causalidade e testar simultaneamente diferentes hipóteses (LEFCHECK, 2016). Neste tipo de análise as variáveis podem ser definidas tanto como preditoras quanto como respostas o que nos permite quantificar tanto efeitos diretos quanto indiretos entre as rotas de ligação. Alterações e inclusão de outras análises numéricas poderão ser incluídas ao longo do projeto para melhor apresentar os resultados da pesquisa.

11.6.7 Parametrização dos dados

Diante da geração de inúmeras informações relevantes, é crucial a descentralização dos dados para que todos os partícipes tenham acesso ao conhecimento adquirido. Dessa forma, o Núcleo de Inteligência Territorial (NIT) ficará responsável pela parametrização, armazenamento e disponibilização da base de dados geradas ao longo do projeto com o uso de ferramentas como Geonode e NITdocs. Ainda, os dados de campo podem ser igualmente obtidos a partir da aquisição por formulários construídos no Giscloud. A principal vantagem é a disponibilização de informações, dados e estatísticas sobre a realidade ambiental das regiões estudadas, garantindo a discussão sobre o processo de desenvolvimento do território e o monitoramento das ações e projetos que impactam o desenvolvimento – como o acompanhamento das metas e indicadores dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).

12. BENEFÍCIOS

- Ampliação da base de dados para algas perifíticas (diatomáceas e macroalgas), macroinvertebrados bentônicos e peixes coletados na região transfronteiriça BR-PY em 24 pontos definidas no projeto Micropoluentes II;
- Ampliação da base de dados para o monitoramento quantitativo de atrazina e

metabólitos em águas superficiais;

- Ampliação da base de dados ambientais coletados a campo além dos determinados em laboratório;
- Verificação da variação das respostas em múltiplos níveis da biodiversidade dentro dos três principais grupos de organismos aquáticos de ambientes lóticos;
- Avaliação da ecologia de comunidades com relação da concentração de micropoluentes com diversidade alfa, composição de espécies e diversidade beta em duas abordagens: clássica in loco e molecular;
- Produção de um protocolo de cDNA para riachos da região;
- Monitoramento de agrotóxicos de outras classes em água e em fígado de peixe, para a verificação de bioacumulação nos ambientes de riacho;
- Reportar os possíveis efeitos tóxicos relacionados à presença destes micropoluentes, por meio da continuidade do estudo do fígado e das brânquias dos peixes coletados;
- Consolidação de parcerias com universidades, centros de pesquisa e instituições públicas e privadas;
- Continua melhora na gestão dos recursos hídricos por meio da ampliação do conhecimento regional.

13. PREMISSAS

- As coletas acontecerão no período estipulado para não prejudicar os resultados gerados;
- As atividades serão executadas respeitando o cronograma do projeto, que poderá ser replanejado mediante necessidade, exemplo: problemas climáticos;
- Será mantido registros das atividades desenvolvidas, com todos os dados referentes ao detalhamento do Projeto;
- Disponibilidade orçamentária por todo o período do convênio;
- O planejamento antecipado para as aquisições (compra de insumos, cronograma de viagem, viagens para congresso e eventos relacionados) incluindo a contratação de serviços de terceiros e importações, deve ser respeitada para evitar atrasos;
- Os equipamentos estarão disponíveis para a execução das análises;

Jil

- Os métodos de quantificação de agrotóxicos selecionados a partir do screening serão estabelecidos a partir do Micropoluentes II.

14. RESTRIÇÕES

15.

- Processo de seleção e a gestão das bolsas e aquisição serão feitas somente pela FPTI-BR em consonância com as descrições e aptidões necessárias ao desenvolvimento do estudo atribuídas pelos parceiros, respeitando processos e normativas internas;
- Quaisquer publicações que contenham Informações demandam autorização prévia de ambos os parceiros.

16. RISCOS

Evento	Probabilidade de ocorrência	Impacto no projeto	Criticidade (Probabilidade x Impacto)	Ação necessária para mitigar o risco.
Falta de recursos humanos	Baixa (30%)	Tempo	Alta	Contratação de bolsistas no início do projeto
Extravio no equipamento	Baixa (30%)	Escopo, Tempo	Alta	Documento de responsabilidade de uso
Riscos cambiais (depreciação da moeda local)	Média (50%)	Custo	Alta	Realizar compras no início do projeto
Tempo hábil para análise dos dados gerados	Alta (70%)	Qualidade, Escopo, Tempo	Alta	Distribuição organizada de atividades
Contratação de PJ em tempo hábil	Alta (70%)	Custo, Qualidade, Escopo, Tempo	Alta	Notificar a equipe e lembrar o gestor de cobrar a abertura de chamado. Cobrar responsáveis para realizar a contratação dentro do prazo estimado
Atrasos na obtenção de resultados	Alta (70%)	Escopo, Tempo	Alta	Revisão do cronograma
Defeito no equipamento	Média (50%)	Qualidade, Tempo, Custo	Alta	Manutenções preventivas devem ser realizadas periodicamente. Treinamento adequado do pessoal.
Re-planejamentos constantes	Média (50%)	Custo, Qualidade, Escopo, Tempo	Alta	Alinhamento dos participantes
Comunicação ineficiente entre membros projeto	Média (50%)	Custo, Qualidade, Escopo, Tempo	Média	Reuniões periódicas para verificação do andamento e alinhamento
Alterações climáticas	Baixa (30%)	Escopo, Tempo	Média	Realizar as coletas com maior proximidade do período previsto
Indisponibilidade de colaborador requerido para atividade	Baixa (30%)	Qualidade, Tempo	Baixa	Definição da equipe constituída, suas funções e responsabilidade de cada integrante do projeto
Não cumprimento do cronograma inicial	Baixa (30%)	Custo, Tempo	Baixa	Verificação constante do andamento do projeto

17. MATRIZ DE INTERESSADOS

Nome/Instituição	Descrição	Categoria
Gen. Luiz F. K. Carbonell (DC.CD) (DC.CE) - Itaipu	Diretor Coordenação - BR	Patrocinador
Miguel Angel Gomez Acosta	Diretor Coordenação - PY	Patrocinador
Gen. Eduardo Castanheira Garrido Alves – FPTI-BR	Diretor Geral	Patrocinador
Rafael José Deitos – FPTI-BR	Diretor Técnico	Patrocinador
Dr. Gleisson A. Pereira de Brito - UNILA	Reitor	Patrocinador
Dr. Ariel Scheffer da Silva	Superintendente MA.CD/IB	Superintendente
Waldir Noronha	Gerente do Departamento MAR.CD/IB	Gerente
Irineu Motter	Gerente MARR.CD	Gerente
Ana Carolina Gossen Siani	Gerente MARR.CE e Coordenadora técnica PY	Gerente
Simone Frederigi Benassi - DC/ITAIPU	Coordenadora Técnica Geral	Gestora
Jussara Elias de Souza - DC/ITAIPU	Coordenadora Técnica Geral (suplente)	Gestora
Fabricio Baron Mussi - ITAIPU	Coordenador Administrativo	Gestor / ADM
Rolf Massao Satake Gugisch – FPTI-BR	Coordenador Administrativo	Gestor / ADM
Dr. Cleto Kaveski Peres - UNILA	Coordenador Técnico Geral	Equipe do projeto
Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira - UNILA	Coordenador Técnico Geral	Equipe do projeto
Dra. Bianca do Amaral – FPTI- BR	Coordenadora Técnica Geral	Equipe do projeto
Ms. Diego Alberto Tavares- FPTI-BR	Colaborador	Equipe do projeto
Natalie Pereira Toyama – FPTI- BR	Colaboradora	Equipe do projeto

Caroline Henn (MARR.CD)	Colaboradora	Equipe do projeto
Cristiane Fiorentin Dotto Veiga	Colaboradora	Equipe do projeto
Maria Eva Lopez Vera (MARR.CE)	Colaboradora	Equipe do projeto
Prof. Pablo Henrique Nunes	Colaborador	Equipe do projeto
Profa. Dra. Gilcelia Aparecida Cordeiro	Colaboradora	Equipe do projeto
Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos	Colaboradora	Equipe do projeto
Professores colaboradores:	Instituição	
Prof. Dr. Aurélio Fajar Tonetto	UNIP - campus de Jundiaí	
Prof. Dr. Claudio de Oliveira	Instituto de Biociências – UNESP	
Prof. Dr. Guilherme José da Costa Silva	Instituto de Biociências–UNESP	

18. EXCLUSÃO DO ESCOPO

Excluem-se do escopo deste Projeto as ações e/ou seus desdobramentos cujos resultados diretos e/ou indiretos não corroboram para as expectativas. Assim, não compõe o escopo deste Projeto:

- Financiamento de ações e/ou soluções levantadas pelos parceiros, que não tenham relação com objetivos e metas do projeto, salvo se a ação influenciar no aprimoramento das metodologias e desenvolvimento do projeto, ou quando houver interesse entre as partes.

19. METAS E ENTREGAS

19.1 Meta 1 - Subprojeto 1: Ecologia de comunidades. Efeitos de micropoluentes na biodiversidade de algas, macroinvertebrados e peixes de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR-PY)

Principais entregas:

- Comportamento das diversidades alfa e beta de algas, macroinvertebrados e peixes frente aos agrotóxicos avaliados;
- Variação da composição de espécies de algas, macroinvertebrados e peixes frente aos agrotóxicos avaliados;
- Potenciais espécies indicadoras da presença dos principais agrotóxicos avaliados;

19.2 Meta 2 - Subprojeto 2: Biomonitoramento - Estudos com DNA ambiental (eDNA) e genômica e populações em riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR-PY)

Principais entregas:

- Diversidade crítica de bactérias, fungos, algas, macroinvertebrados e peixes existentes nos riachos da região;
- Perfil das metacomunidades nos diferentes gradientes de uso e ocupação de solo e de presença de agrotóxicos avaliados;
- Protocolo de análise de DNA ambiental na região para monitorar micropoluentes e qualidade da água;
- Resposta das espécies de algas, macroinvertebrados e peixes detectados em DNA ambiental frente aos agrotóxicos avaliados;
- Quais os níveis de diversidade genética e estruturação populacional e como estas respondem aos micropoluentes;

19.3 Meta 3 - Subprojeto 3: Mutagênese e Histologia de peixes e macroinvertebrados de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR-PY)

Principais entregas:

- Principais alterações nos tecidos de fígado e brânquias de peixes e associação com os ambientes com elevadas cargas de agrotóxicos avaliados;
- Relações de quais os índices mutagênicos em sangue de peixes e tecidos de invertebrados podem ser relacionadas agrotóxicos avaliados;
- Protocolo de análise de qualidade da água e risco ambiental por ensaios mutagênicos;

19.4 Meta 4 - Subprojeto 4: Determinação de agrotóxicos em águas superficiais dos riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR-PY)

Principais entregas:

- Estabelecer e validar protocolo de análise de agrotóxico em águas superficiais;
- Apresentar os níveis de concentração dos agrotóxicos avaliados;
- Levantamento e determinação dos principais parâmetros de qualidade da água (N e P total e cromatografia iônica).

19.5 Meta 5 - Subprojeto 5: Determinação de agrotóxicos em fígado de peixe de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu – região transfronteiriça (BR-PY)

Principais entregas:

- Selecionar os agrotóxicos para determinação em fígado de peixe;
- Otimizar um método de extração baseado em QuEChERS;
- Otimizar um método de determinação por GC-MS;
- Estabelecer e validar os métodos analíticos para quantificação de agrotóxicos em fígado de peixe;
- Monitoramento da concentração quantificada nas campanhas amostrais.

20. PRODUTO FINAL

Ao final do projeto, o que pretende-se entregar uma investigação científica completa sobre os efeitos de micropoluentes sobre a biodiversidade aquática em riachos da região transfronteiriça (Brasil e Paraguai) e também apresentar os protocolos para o biomonitoramento.

21. NÍVEL DE MATURIDADE TECNOLÓGICA (TRL)

Com base na metodologia TRL (Technology Readiness Level), que avalia o nível de maturidade tecnológica dos projetos, este projeto tem seu início no TRL nível 5 (cinco), sendo que até sua conclusão, onde entregará o produto acima descrito, terá alcançado o TRL nível 7 (sete).

22. MECANISMOS GERENCIAIS DE CONTROLE DE METAS

Para facilitar a comunicação e execução do projeto a coordenação geral e técnica junto com os coordenadores de cada sub-projeto, realizarão reuniões trimestrais para alinhamento das metas e atividades para atendimento dos objetivos. Semestralmente serão realizadas reuniões com as equipes de cada sub-projeto para dialogar sobre as pesquisas e o andamento das metas e atividades previstas cronograma.

Ferramentas de gerenciamento de projetos como o JIRA e Redmine serão utilizadas para o acompanhamento do andamento das atividades propostas, juntamente com os relatórios trimestrais.

Será utilizada a ferramenta NITDocs para a gestão do conhecimento socializando todos os resultados e relatórios produzidos durante o desenvolvimento do projeto.

23. QUADRO RESUMO ORÇAMENTÁRIO

INSTITUIÇÃO	VALOR
ITAIPU BINACIONAL – FINANCEIRO	R\$ 2.387.939,20
FPTI-BR – ECONÔMICO	R\$374.528,31
UNILA - ECONÔMICO	R\$2.015.800,00
TOTAL	R\$ 4.778.267,51

24. CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO FINANCEIRO

O primeiro pagamento (T1 – ano 1) ocorrerá 10 dias após a assinatura do convênio e pedido de repasse como forma de mobilização orçamentária e os pagamentos subsequentes ocorrerão após a prestação de contas do trimestre anterior.

CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO ITAIPU (R\$)													
ITEM	RUBRICA	CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO ITAIPU (R\$)											
		Ano 1			Ano 2			Ano 3			TOTAL POR RUBRICA		
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10		
CUSTEIO	1. Recursos Humanos	R\$ -	R\$ -	R\$ -	R\$ -	R\$ 129.915,00	R\$ 129.915,00	R\$ 129.915,00	R\$ 129.915,00	R\$ 129.915,00	R\$ 129.915,00	R\$ 779.490,00	
	2. Bolsas	R\$ -	R\$ 89.250,00	R\$ 89.250,00	R\$ 89.250,00	R\$ 89.250,00	R\$ 89.250,00	R\$ 89.250,00	R\$ 89.250,00	R\$ 89.250,00	-	R\$ 714.000,00	
INVESTIMENTO	3. Material Permanente	R\$ 215.500,00	R\$ -	R\$ -	R\$ -	R\$ -	R\$ -	R\$ -	R\$ -	R\$ -	-	R\$ 215.500,00	
	4. Material de Consumo	R\$ 62.375,00	R\$ 58.375,00	R\$ 40.375,00	R\$ 40.375,00	R\$ 40.375,00	R\$ 40.375,00	R\$ 15.375,00	R\$ 10.375,00	R\$ 5.000,00	-	R\$ 313.000,00	
CUSTEIO	5. Passagens e Diárias	R\$ -	R\$ -	R\$ 32.956,40	R\$ 32.956,40	R\$ -	R\$ 8.816,00	R\$ 41.772,40	R\$ 8.816,00	R\$ 8.816,00	R\$ 8.816,00	R\$ 142.949,20	
	6. Serviços de Terceiros	R\$ -	R\$ 24.750,00	R\$ 34.750,00	R\$ 54.750,00	R\$ 9.750,00	R\$ 57.750,00	R\$ 12.750,00	R\$ 12.750,00	R\$ 12.750,00	R\$ 3.000,00	R\$ 223.000,00	
Total trimestral		R\$ 277.875,00	R\$ 172.375,00	R\$ 197.331,40	R\$ 217.331,40	R\$ 269.290,00	R\$ 326.106,00	R\$ 289.062,40	R\$ 251.106,00	R\$ 243.731,00	R\$ 141.731,00	R\$ 2.387.939,20	

1 A prestação de contas referente à execução por natureza de gastos será com base na planilha acima.

2 O detalhamento dos itens previstos no desembolso financeiro consta no Anexo I deste Plano de Trabalho, e se referem apenas a uma memória de cálculo para compor os valores das rubricas, não sendo utilizada como base para as prestações de contas.

25. CRONOGRAMA FÍSICO E MATRIZ DE RESPONSABILIDADES DE CADA INSTITUIÇÃO

META 1 - Ecologia de comunidades. Efeitos de micropoluentes na biodiversidade de algas, macroinvertebrados e peixes de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu - região transfronteiriça (BR-PY).																																			
Nº	ENTREGA	ITAIPU	UNILA	FPTI	1º ano												2º ano												Total						
					M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	%
1.1	Seleção dos Bolsistas	N, A	P, A, R	E, A, R	17%	17%	17%	17%	17%																									100%	
1.2	Aquisição de Equipamentos Permanentes	N, A	P	E, R	33%	33%	33%																											100%	
1.3	Aquisição de Reagentes, Insumos e vidrarias	N	P	E, R	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%																		100%	
1.4	Coleta em campo	N	E	N, P													11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%											100%	
1.5	Análises Laboratoriais (Triagem, identificação, etc.)	N	E, R	N													7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%				100%	
1.6	Análises Estatísticas	N	E, R	N																															100%
1.7	Entrega dos Resultados dos bolsistas	N, A	E, R	N, A															10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	100%	
1.8	Relatório Parcial	N, A	E, R	E, A															10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	100%	
1.9	Divulgação dos Resultados	A	E, R, A	N, A																															100%
1.10	Relatório Final do Coordenador	A	E, R	N																															100%

(A) Aprova - (E) Executa - (I) Informa - (P) Participa - (N) Notificado - (R) Responsável

[illegible]

(A) Aprova - (E) Executa - (I) Informa - (P) Participa - (N) Notificado - (R) Responsável

META 3 - Mutagenese e Histologia de peixes e macroinvertebrados de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu - região transfronteiriça (BR-PY).

Nº	ENTREGA	ITAIPU	UNILA	FPTI	1º ano												2º ano												3º ano					Total		
					M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	%	% Físico da Meta
3,1	Seleção das Bolsas	N, A	P, A, R	E, A, R	17%	17%	17%	17%	17%																									100%		
3,2	Aquisição de Equipamentos Permanentes	N, A	P	E, R	33%	33%	33%																											100%		
3,3	Aquisição de Reagentes, Insumos e vidrarias	N	P	E, R	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%															100%		
3,4	Análises Laboratoriais (Tragem, identificação, etc.)	N	E, R	N													7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	100%		
3,5	Análise dos dados	N	E, R	N																														100%		
3,6	Entrega dos Relatórios dos bolsistas	N, A	E, R	N, A			10%		10%										10%															10%	20%	
3,7	Protocolo de Análise de Qualidade de Água e Risco Ambiental por Exatões Mutagênicos	N	E, R	N																														100%		
3,8	Relatório Parcial	N, A	E, R	E, A			10%		10%										10%															10%		
3,9	Dredação dos Resultados	A	E, R, A	N, A																															100%	
3,10	Relatório Final do Coordenador	A	E, R	N																															100%	

(A) Aprova - (E) Executa - (I) Informa - (P) Participa - (N) Notificado - (R) Responsável

META 4 - Determinação de agrotóxicos em águas superficiais dos rios das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu - região transfronteiriça (BR-PY)																																			
ENTREGA	ITAIPU	UNILA	FPTI	1º ano												2º ano												3º ano					Total		
				M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	%	% Físico da Meta
4,1	Seleção dos Bolotas	N, A	N	E, R	37%	17%	17%	17%	17%																										100%
4,2	Aquisição dos equipamentos permanentes	N, A	N	E, R	33%	33%	33%																												100%
4,3	Aquisição de Reagentes, frascos e vidrarias	N, A	N	E, R	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	100%	
4,4	Análises Laboratoriais	N	N	E, R																															100%
4,5	Entrega dos Relatórios dos bolotas	N	N	E, R																															100%
4,6	Validação dos protocolos de análises de agrotóxicos	N	N	E, R																															100%
4,7	Relatório parcial	N, A	N	E, R																															100%
4,8	Divulgação dos Resultados	P, A	N, A	E, R																															100%
4,9	Relatório Final do Coordenador	N	N	E, R																															100%

(A) Aprova - (E) Executa - (I) Informa - (P) Participa - (N) Notificado - (R) Responsável

META 5- Subprojeto 5- Determinação de agrotóxicos em líquido de peixe de riachos das microbacias do entorno do Reservatório de Itaipu - região transfronteiriça (BR-PY)

N°	ENTREGA	ITAIPU	UNILA	PPTI	1º ano												2º ano												3º ano					Total		
					M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	%	% Físico da Meta
5,1	Seleção dos Boletins	N, A	N	E, R	17%	17%	17%	17%	17%																									100%		
5,2	Aquisição de Reagentes, insumos e vidrarias	N,	N	E, R	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%														100%		
5,3	Seleção de Agrotóxicos	N	N	E, R	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%	11%															100%	
5,4	Análises Laboratoriais	N	N	E, R					3%	5%	5%	3%	5%	5%	3%	3%	3%	3%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%						100%	
5,5	Entrega dos Relatórios dos boletins	N	N	E, R		10%			10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	100%	20%
5,6	Relatório parcial	N, A	N	E, R	10%	10%			10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%															100%	
5,7	Divulgação dos Resultados	N	N, A	E, R																			17%	17%	17%	17%	17%	17%	17%						100%	
5,8	Relatório Final do Coordenador	N	N	E, R																															100%	

(A) Aprova - (E) Executa - (I) Informa - (P) Participa - (N) Notificado - (R) Responsável

21-1

26. PRESTAÇÃO DE CONTAS

Visto que a execução do recurso financeiro repassado pela ITAIPU BINACIONAL estará a cargo da FUNDAÇÃO PTI-BR, a prestação de contas será entregue até o 10º dia útil de cada trimestre à ITAIPU, a fim de acompanhar as execuções da aplicabilidade regular do recurso.

A Prestação de Contas Final será apresentada até 60 (sessenta) dias corridos contados a partir da data final de vigência do convênio.

27. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOHESSI, P. T. TOKO, I. I.; ATCHOU, V.; TONATO, R.; MANDIKI, S. N. M.; KESTEMON, P. Pesticides used in cotton production affect reproductive development, endocrine regulation, liver status and offspring fitness in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 167, 157–172, 2015.

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M. & GOMES, L.C. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade* 1(1): 70-78.

ALLAN, J.D. & CASTILLO, M.M. 2007. *Stream Ecology: structure and function of running waters*. Second Edition. Springer, Netherlands.

ALLAN, J.D. 2004. Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 257-84.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R., BRITO, N.M. & RIBEIRO, M.I. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação. *Química Nova* 25(4): 589-593.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANTUNES, A.M. Avaliação da exposição aguda e sub-letal ao Glifosato (N-fosfometilglicina) e ao AMPA (ácido amino-metil-fosfônico) em brânquias e fígado de *Poecilia reticulata* com o emprego de biomarcadores moleculares e morfológicos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Mestrado: Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Goiás, 2013.

APHA. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition. Washington, DC. American Public Health Association.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; AGOSTINHO, A.A. & FABRÉ, N.F. 1995. Trophic aspects of fish communities in brazilian rivers and reservoirs. In: TUNDISI, J.G.; BICUDO, C.E.M. & TUNDISI, T.M. eds. *Limnology in Brazil*. Academia Brasileira de Ciências e Sociedade Brasileira de Limnologia, Rio de Janeiro, p. 105-136.

ASATI, A.; SATYANARAYANA, G. N. V.; SRIVASTAVA, V. T.; PATEL, D. K. Determination of organochlorine compounds in fish liver by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection. *J. Chromatogr. A* 1561, p. 20–27, 2018.

AZEVEDO, A. F. & CHASIN, A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: RiMa, p.277-280, 2004.

BARBOUR, M.T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D. & STRIBLING, J.B. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.

BARBUKHO, O. V. Ecological-toxicological Assessment of the Desna River and Adjacent Floodplain Lakes (within the Chernigiv Region) in Terms of Pesticides Content in Fish Liver. *Hydrobiological Journal*, Vol. 52, No. 4, p. 96-106, 2016.

BARNES, M.A.; TURNER, C.R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17 (2016), 1-17.

BARTOZEK, E.C.R.; BUENO, N.C.; LUDWIG, T.A.V.; TREMARIN, P.I.; NARDELLI, M.S. & ROCHA, A.C.R. 2013. Diatoms (Bacillariophyceae) of Iguaçu National Park, Foz do Iguaçu, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 108-123.

BATTARBEE, R.W.; JONES, V.; FLOWER, R.J.; CAMERON, N.; BENNION, H.; CARVALHO, L. & JUGGINS, S. 2001. Diatoms. In: SMOL, J.P.; BIRKS, H.J.B. & LAST, W.M. (eds.). *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*. London: Kluwer Academic Publishers, v.3. p. 155-203.

BLOCKSOM et al. Persistent organic pollutants in fish tissue in the mid-continental great rivers of the United States. *Sci Total Environ.* v. 408, p.1180–1189, 2010.

BÖHLKE, J.; WEITZMANN, S.H. & MENEZES, N.A. 1978. Estado atual da sistemática de peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazonica* 8: 657-677.

BRANCO, C.C.Z. & NECCHI, O.Jr. 1996. Survey of stream macroalgae of eastern Atlantic Rainforest of São Paulo State, Southeastern Brazil. *Algological Studies* 80: 35-57.

BRANCO, C.C.Z.; KRUPKE, R.A. & PERES, C.K. 2009. Ecological distribution of stream macroalgal communities from mid-western region of Paraná State, Southern Brazil: evidence of the importance of local scale variation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52(2): 379-386.

BRANCO, C.C.Z.; NECCHI, O.Jr. & PERES, C.K. 2010. Effects of artificial substratum types and exposure time on macroalgal colonization in a tropical stream. *Fundamental and Applied Limnology* 178: 17-27.

BRANCO, L.H.Z. & NECCHI, O.Jr. 1998. Distribution of macroalgae in three tropical drainage basins of Southeastern Brazil. *Archiv für Hydrobiologie* 142: 241-256.

BRASIL. (2005). Ministério da Integração Nacional; Ministério do Meio Ambiente. Plano Amazônia Sustentável. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.integracao.gov.br/pdf/ministerio/pas.pdf>>.

BRASIL. 2005. Ministério da Integração Nacional; Ministério do Meio Ambiente. Plano Amazônia Sustentável. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.integracao.gov.br/pdf/ministerio/pas.pdf>>.

BÜCKER, A.; CONCEIÇÃO, M.B. (2004). Avaliação da genotoxicidade por frequência de Micronúcleos em eritrócitos de tilápias expostas às águas do Rio Itajaí-Açu e Itajaí-Mirim, Santa Catarina-Brasil.

BUCKUP, P.A.; MENZES, N.A. & GHAZZI, M.S. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro, Brasil: Museu Nacional.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; MENEZES, E. J.; ESCARRONE, A. L. V.; MARTINS, C. M. G.; BIANCHINI, A.; PRIMEL, E. G. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. *Talanta* 112, 63–68, 2013.

CALLISTO, M.; ESTEVES, F. A. Distribuição da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em um lago amazônico impactado por rejeito de bauxita, Lago Batata (Pará, Brasil). *Oecologia Brasiliensis*, v. 1, 1995.

CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 326-350. 1994.

CASTRO, R.M.C. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos. In: CARAMASCHI, E.P.R.; MAZZONI, R.; PERES- NETO, P.R. (Ed.). *Ecologia de peixes de riachos*, Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p.139-155. (Série *Oecologia Brasiliensis*).

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z. & LIMA, F.C.T. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotropica* 3 (1).

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; MELO, A.L.A.; MARTINS, L.S.F.; FERREIRA, K.M.; GIBRAN, F.Z.; BENINE, R.C.; CARVALHO, M.; RIBEIRO, A.C.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; DARDIS, G.Z.P.; STOPIGLIA, R. & LANGEANI, F. 2004 Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 4 (1).

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; VARI, R.P.; MELO, A.L.A.; MARTINS, L.S.F.; ABREU, T.X.; BENINE, R.C.; GIBRAN, F.Z.; RIBEIRO, A.C.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; PELIÇÃO, G.Z.; FERREIRA, K.M.; STOPIGLIA, R. & AKAMA, A. 2005. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 16(3): 193-214.

CEBALLOS, G.; EHRLICH, P.R.; BARNOSKY, A.D.; GARCÍA, A.; PRINGLE, R.M. & PALMER, T.M. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: entering in the sixth mass extinction. *Science Advances* 1(5): e1400253.

CECCON, J.P. Indicadores biológicos para avaliação de riachos Neotropicais: protocolo de avaliação rápida e biomarcadores em *Astyanax spp.* Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Doutorado em Biologia Comparada do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, p.15, 2016.

CHAO, A. 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal Catchability. *Biometrics* 43(4):783-791.

CHAPIN, F.S.; LUBCHENCO, J. & REYNOLDS, H.L. 1995. Biodiversity effects on patterns and processes of communities and ecosystems. pp. 289-301. In: HEYWOOD V.H. (ed.). *Global Biodiversity Assessment*, UNEP. Cambridge University Press, Cambridge.

CHASE, J.M. 2010. Stochastic community assembly causes higher biodiversity in more productive environments. *Science* 328: 1388-1391.

COLLINS, A.R., M. Dušinská, and A. Horská. 2001. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay *Act.Biochim.Polonica*. 48(3):611-614.

CONAMA – (2000) Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2000. Resolução Nº 273 - 29 de novembro de. Conselho

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (2003). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcanje, v.1. 424pp.

DAJOZ, R. 1978. *Ecologia Geral*. Editora Vozes, Rio de Janeiro.

DELLA-FLORA, A.; BECKER, R. W.; BENASSI, S. F.; TOCI, A. T.; Cordeiro, G. A.; IBAÑEZ, 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*, 669, p. 248–257, 2019.

Di BITETTI, M.S.; PLACCI, G. & DIETZ, L.A. 2003. Uma visão de Biodiversidade para a Ecorregião Florestas do Alto Paraná – Bioma Mata Atlântica: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação. Washington, D.C.: World Wildlife Fund.

DIGBY, P.G.N. & KEMPTON, R.A. 1987. Multivariate analysis of ecological communities. Chapman & Hall, London.

DONOHUE, I.; JACKSON, A.L.; PUSCH M.T. & IRVINE K. 2009. Nutrient enrichment homogenizes lake benthic assemblages at local and regional scales. *Ecology* 90(12): 3470-3477.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A.H.; GESSNE, M.O.; KAWABATA, Z.; KNOWLER, D.J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R.J.; PIEUR-RICHARD, A.; SOTO, D.; STIASSNY, M.L.J. & SULLIVAN, C.A. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biology Reviews* 81: 163-182.

DÜPONT, A.; LOBO, E.A.; COSTA, A.B. & SCHUCH, M. 2007. Avaliação da qualidade da água do Arroio do Couto, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. *Caderno de Pesquisa. Série Biologia (UNISC)* 9: 20-31.

ENTWISLE, T.J. 1990. Macroalgae in the upper Yarra and Watts River catchments: distribution and phenology. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 41: 505-522.

EUROPEAN UNION. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* 327: 1-73.

FENECH, M. (2000). *The in vitro micronucleus technique*. *Mutation Research*. n° 455. p.81-95.

FERREIRA, K.S.M. & BICUDO, C.E.M. 2017. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algae, 42: Bacillariophyceae (Surirellales). *Hoehnea* 44(1): 10-28.

FICETOLA, G.F.; MIAUD, C.; POMPANON, F.; TABERLET, P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.*, 4 (2008), 423-425.

FIELD, R.; HAWKINS, B.A.; CORNELL, H.V.; CURRIE, D.J.; DINIZ-FILHO, A.F.; GUÉNAN, F.F.; KAUFMAN, D.M.; KERR, J.T.; MITTELBACHS, G.G.; OBERDORFF, T.; O'BRIEN, E.M.; TURNER, J.R.G. 2009. Spatial species-richness gradients across scales: a meta-analysis. *Journal of Biogeography* 36: 132-147.

FILKIN, N.R.; SHERWOOD, A.R. & VIS, M.L. 2003. Macroalgae from 23 streams in the Hawaiian Islands. *Pacific Science* 57(4): 421-431.

FINLAY, K.W. & WILKINSON, G.N. 1963. The analysis of adaptation in a Plant-Breeding Programme. *Australian Journal of Agricultural Research* 14(5): 742-754.

FOERSTER, J.; GUTOWSKI, A. & SCHAUMBURG, J. 2004. Defining types of running waters in Germany using benthic algae: A prerequisite for monitoring according to the Water Framework Directive. *Journal of Applied Phycology* 16: 407-418.

FRANKHAM, R.; Ballou, J. D. & Briscoe, D.A. (2008). Fundamentos da Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 262pp

GALVES, W; SHIBATTA, O. & JEREP, F. 2009. Estudos sobre a diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná: uma revisão histórica. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 30(2): 141-154.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. Atlas of Fish Histology, Enfield, NH: Science

J.L

Publishers, 224 p., 2009.

GERÓNIMO, E.; APARICIO, V. C.; BARBARO, S.; PORTOCARRERO, R.; JAIME, S.; COSTA, J. L. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107, 423–431, 2014.

GILLER, P.S. & MALMQVIST, B. 1998. The biology of streams and rivers: biology of habitat. Oxford: Oxford University Press, 296p.

GONÇALVES, L.M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALLA-JUNIOR, C. (2003). Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açu e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa. In: *II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL*, 2003. Itajaí, SC. Livro de Resumos. Vol. I. Itajaí: UNIVALI, p 384.

GOTELLI, N.J. & COLWELL, R.K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4(4): 379-391.

GRAVILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *N Biotechnol.* 32(1):147-56, 2015

GUO, Y.; MENG, X.; TANG, H. ZENG, E. Y. Tissue distribution of organochlorine pesticides in fish collected from the Pearl River Delta, China: Implications for fishery input source and bioaccumulation. *Environmental Pollution* 155, 150-156, 2008.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. (2003). *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay*. *Mutagenesis*. Vol. 18 (1). p. 45-51.

HEDDLE, J. A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Volume 18, Issue 2, Pages 187-190

HERMANY, G.; LOBO, E.A.; SCHWARZBOLD, A. & OLIVEIRA, M.A. 2006. Ecology of the epilithic diatom community in a low-order stream system of the Guaíba hidrographical region: subsidies to the environmental monitoring of southern brazilian aquatic system. *Acta Limnologica Brasiliensia* 18: 9-27.

HINTON, D.E. et al. Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p. 155-208.

HU, B.F. & XIE, S.L. 2006. Effect of seasonality on distribution of macroalgae in a stream system (Xin'an Spring) in Shanxi Province, North China. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(8): 889-896.

IBGE. 1992. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro: Série Manuais Técnicos em Geociências, n. 07, 92 p.

IUCN (2016). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-1*. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 30 August 2016.

JOHANNESSON, K.; ANDRÉ, C. Life on the margin: genetic isolation and diversity loss in a peripheral marine ecosystem, the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 15: 2013–2029, 2006.

JORGENSEN, S. E. Handbook of ecological models used in ecosystem and environmental management. Denmark: Copenhagen University. 2011.

JUNK, W.J. 2007. Freshwater fishes of South America: Their biodiversity, fisheries, and habitats – a synthesis. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10(2):228- 242.

KACZYŃSKI, P.; LOZOWICKA, B.; PERKOWSKI, M.; SZABUŃKO, J. Multiclass pesticide

residue analysis in fish muscle and liver on one-step extraction-cleanup strategy coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 138, 179–189, 2017

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(5): 230-241, 2002.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ZECH, W. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *Journal of Environmental Quality*, v. 31, p. 256-268, 2002

LAMBERTI, G.A. 1996. The role of periphyton in benthic food webs. In: STEVENSON, R.J.; BOTHWELL, M. & LOWE, R.L. (Ed.) *Algal Ecology: freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego. p. 533-564.

LANGEANI, F.; et al. 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* 7(3):181-197.

LEE, S.M. & CHAO, A. 1994. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. *Biometrics* 50(1):88-97.

LEIBOLD, M.A.; HOLYOAK, M.; MOUQUET, N.; AMARASEKARE, P.; CHASE, J.M.; HOOPEES, M.F.; HOLT, R.D.; SHURIN, J.B.; LAW, R.; TILMAN, D.; LOUREAU, M.; GONZALEZ, A. 2004. The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters* 7: 601-613.

LEUKART, P. 1995. Studies on the macroalgal vegetation of a small soft-water stream in the Spessart mountains, Germany, with reference to algal distribution and seasonality. *Algological Studies* 79: 77-92.

LIGIER, H.D. 2000. Caracterización geomorfológica y edáfica de la provincia de Misiones. Informe para Fundación Vida Silvestre Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Corrientes.

LOBO, E.A., HEINRICH, C.G., SCHUCH, M., DÜPONT, A., COSTA, A.B., WETZEL, C.E. & ECTOR, L. 2016. Índice Trófico de Qualidade da Água: guia ilustrado para sistemas lóticos subtropicais e temperados brasileiros. EDUNISC, Santa Cruz do Sul, RS, 58p.

LOBO, E.A.; BES, D.; TUDESQUE, L. & ECTOR, L. 2004. Water Quality Assessment of the Pardo River, RS, Brazil, using epilithic diatom assemblages and faecal coliforms as biological indicators. *Vie Milieu* 54(2-3): 115-125.

LOBO, E.A.; CALLEGARO, V.L.M. & BENDER, E.P. 2002. Utilização das algas diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em rios e arroios da Região Hidrográfica de Guaíba, RS, Brasil. 1 ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc. 127 p.

LOGUE, J.B.; MOUQUET, N.; PETER, H.; HILLEBRAND, H.; THE METACOMMUNITY WORKING GROUP. 2011. Empirical approaches to metacommunities: a review and comparison with theory. *Trends in Ecology and Evolution* 26(9): 482-491.

R. LOOS, G. LOCORO, S. COMERO, S. CONTINI, D. SCHWESIG, F. WERRES, et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res*, 44, pp. 4115-4126, 2010.

LOWE-McCONNELL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 382 p.

LOWE-McCONNELL, R.H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 534 p.

MAGURRAN, A.E. 1988. *Ecological diversity and its measurements*. Cambridge University Press, London.

- MAITLAND, P.S. 1978. Biology of fresh waters. Glasgow: Blackie, 244 p.
- MANLY, B.F.J. 1997. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. London: Chapman & Hall. 281 p.
- MARENGO, J.A. 2006. Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília: MMA, 2006.
- MARQUES, M.M.; BARBOSA, F.A.R. Na fauna do fundo, o retrato da degradação. *Ciência Hoje*, v.30, p. 72-75, 2001.
- MARRA, R.C.; TREMARIN, P.I.; ALGARTE, V.M. & LUDWIG, T.A.V. 2016. Epiphytic diatoms (Diatomeae) from Piraquara II urban reservoir, Paraná state. *Biota Neotropica* 16(4): e20160200.
- MCCUNE, B. & MEFFORD, M.J. 1999. Multivariate analysis of ecological data. MjM Software, Glendern Beach, OR.
- MELA, M - Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *ESLSEVIER – Ecotoxicologia e Segurança Ambiental*, 93 – pg 13-21. 2013.
- MENDONZA, J.S. 2015. Influência da exposição à atrazina e glifosato no desenvolvimento ósseo de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). Dissertação de mestrado, Uberlândia, 80p.
- MENEZES, N.A.; CASTRO, R.M.C.; WEITZMAN, S.H. & WEITZMAN, M.J. 1990. Peixes de riacho da Floresta Atlântica Costeira Brasileira: um conjunto pouco conhecido e ameaçado de vertebrados. In II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira: Estrutura, Função e Manejo. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1: 290-295.
- MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustains it. *Systematic Biology*, 51(2): 238-254, 2002.
- MOUILLOT, D. & LEPRÊTRE, A. 1999. A comparison of species diversity estimators. *Research Population Ecology* 41:203-215.
- NECCHI, O.Jr.; BRANCO, C.C.Z. & BRANCO, L.H.Z. 2000. Distribution of stream macroalgae in São Paulo State, Southeastern Brazil. *Algological Studies* 97: 43-57.
- NECCHI, O.Jr.; BRANCO, L.H.Z. & BRANCO, C.C.Z. 2003. Ecological distribution of stream macroalgal communities from a drainage basin in the Serra da Canastra National Park, Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 63: 1-12.
- NECCHI, O.Jr.; DIP, M.R. & GÓES, R.M. 1991. Macroalgae of a stream in Southeastern Brazil: composition, seasonal variation and relation to physical and chemical variables. *Hydrobiologia* 213: 241-250.
- NECCHI, O.Jr.; PASCOALOTO, D. & BRANCO, L.H.Z. 1994. Distribution of macroalgae in a tropical river basin from Southeastern Brazil. *Archiv für Hydrobiologie* 129: 459- 471.
- NESSIMIAN, J.L.; VENTICINQUE, E.M.; ZUANON, J.; MARCO Jr, P.; GORDO, M.; FIDELIS, L.; BATISTA, J. & JUAN, L. 2008. Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams. *Hydrobiologia* 614 (1): 117-131.
- NOGUEIRA, E. N.; DORES, E. F. G. C.; PINTO, A. A.; AMORIN, R. S. S.; RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C. Currently Used Pesticides in Water Matrices in Central-Western Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 23, No. 8, 1476-1487, 2012.
- OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de toxicologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.135.



- ÖHLKE, J.; WEITZMANN, S.H. & MENEZES, N.A. (1978). Estado atual da sistemática de peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazonica* 8: 657-677.
- OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; O'HARA, B. & STEVENS, M.H.H. 2007. Vegan: Community Ecology Package. [s.n.], [S.L.], R package version 1.8-8.
- PAPPAS, J.L. & STOERMER, E.F. 1996. Quantitative method for determining a representative algal sample count. *Journal of Phycology* 32: 393-696.
- PEREIRA, M.C.B. & SCROCCARO, J.L. 2010. Bacias Hidrográficas do Paraná. Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMA. Curitiba: SEMA, 138 p.
- PERES, C.K. 2011. Taxonomia, distribuição ambiental e considerações biogeográficas de algas verdes macroscópicas em ambientes lóticos de unidades de conservação do Sul do Brasil. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual Paulista/ Campus de Rio Claro. Rio Claro. 220p.
- PERES, C.K.; TONETTO, A.F.; GAREY, M.V. & BRANCO, C.C.Z. 2017. Canopy cover as the key factor for occurrence and species richness of subtropical stream green algae (Chlorophyta). *Aquatic Botany* 137: 24-29.
- PERES-NETO, P.R. & LEGENDRE, P. 2010. Estimating and controlling for spatial structure in the study of ecological communities. *Global Ecology and Biogeography* 19: 174-184.
- PÉREZ, G.R. 1996. Guía para el estudio de los macroinvertebrados acuáticos del Departamento de Antioquia. Universidad de Antioquia, p217.
- PORTO JIR, ARAÚJO CSO AND FELDBERG E (2005) Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environ Res* 97:287-292.
- POSSAVATZ, J.; ZEILHOFER, P.; PINTO, A. A.; TIVES, A. L.; DORES, E. F. G. C. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Revista Ambiente Água*, vol. 9, n. 1, p. 83-96, 2014
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- REDLEY, M. A teoria da seleção Neutra. In: FERRRIRA, H.; PASSAGLIA, L.; FISCHER, R. (Eds.). . *Evolução*. Laser Haus ed. Porto Alegre - RS: Artmed, 2013. p. 125-162.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O. & FERRARIS, C. 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA). Porto Alegre: Edipucrs.
- REUSCH, T. B. H. et al. Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 8, p. 2826-2831, 2005.
- RIBEIRO, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (2003). *Mutagênese Ambiental*. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 356pp.
- RICHARDSON, et al. The use of liver histopathology, lipid peroxidation and acetylcholinesterase assays as biomarkers of contaminant-induced stress in the Cape stumpnose, *Rhabdosargus holubi* (Teleostei: Sparidae), from selected South African estuaries. *Water SA* Vol. 36 No. 4 July 2010. p.409. Disponível em: <http://www.wrc.org.za>.
- RODRIGUES, L.B. - Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos. Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás. p.32, 2016.
- RONCO, A.E., MARINO, D.J.G., ABELANDO, M. et al Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess.* 188,4 58 (2016).

- RUPPERT, K.M.; KLINE, R.J.; RAHMAN, M.S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17: e00547.
- SABINO, J. & CASTRO, R.M.C. 1990. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da floresta Atlântica (sudeste do Brasil). *Revista Brasileira Biologia* 50:23-36.
- SALOMONI, S.E.; ROCHA, O.; CALLEGARO, V.L.M. & LOBO, E.A. 2005. Epilithic diatoms as indicators of water quality in the Gravataí river, Rio Grande do Sul, Brazil. *Hydrobiologia*: 1-14.
- SCHAEFER, S.A. 1998. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S. & LUCENA, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Edipucrs, p. 375-400.
- SHEATH, R.G. & BURKHOLDER, J. 1985. Characteristics of softwater stream in Rhode Island. II: Composition and seasonal dynamics of macroalgae communities. *Hydrobiologia* 128: 109-118.
- SHEATH, R.G. & COLE, K.M. 1992. Biogeography of stream macroalgae in North America. *Journal of Phycology* 28: 448-460.
- SHEATH, R.G.; HAMBROOK, J.A. & NERONE, C.A. 1988. The benthic macro-algae of Georgia Bay, the North Channel and their drainage basin. *Hydrobiologia* 163: 141-148.
- SHEATH, R.G.; HAMILTON, P.B.; HAMBROOK, J.A. & COLE, K.M. 1989. Stream macroalgae of Eastern boreal forest region of North America. *Canadian Journal of Botany* 67: 3553-3562.
- SHEATH, R.G.; MORISON, M.O.; KORCH, J.E.; KACZMARCZYK, D. & COLE, K.M. 1986. Distribution of stream macroalgae in South-central Alaska. *Hydrobiologia* 135: 259-269.
- SICHOCKI, D.; GOTT, R. M.; FUGA, C. A. G.; AQUINO, L. A.; RUAS, R. A. A.; NUNES, P. H. M. P. (2014). Resposta do milho safrinha à doses de nitrogênio e de fósforo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.13, n.1, p. 48-58.
- SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, 34, 2011, p. 665-676.
- SILVA, M.F. Análise histopatológica de fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas ao herbicida 2,4-d comercial. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Graduação em Ecologia. Rio Claro – SP, p.15-23; p. 27, 2015.
- SILVA, A. G. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. p.25-27. Londrina – PR, 2004.
- SINGH, N. P. *et al.* 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* v. 175, p. 184-191.
- SISINO, C.L.S.; FILHO, E. C.O., *Princípios da toxicologia ambiental: conceitos e aplicações*. Rio de Janeiro: Interciências, p.23., 2013.
- SMITH, W.S. & PETRERE, M.Jr. 2000. Caracterização limnológica da bacia de drenagem do rio Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Acta Limnológica Brasiliensis* 12: 15-27.
- SMOL, J.P. 2008. *Pollution of lakes and rivers: a paleoenvironmental perspective*. 2 ed. 383p.
- SOININEN, J. 2007. Environmental and spatial control of freshwater diatoms - a review. *Diatom Research* 22: 473-490.

STRAYER, D.L. & DUDGEON, D. 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society* 29: 344-358.

STUART, M. E., LAPWORTH, D.J., CRANE, E. et al. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ* 416:1-21, 2012.

TEMPLETON, A. R. Genética de populações e teoria microevolutiva. 1ed. Sociedade Brasileira de Genética. 2011. 705p.

ter BRAAK, C.J.F. 1988. CANOCO - as extension of DECORANA to analyze species-environment relationships. *Vegetatio* 75: 159-160.

UEDA, T. et al. (1992). A preliminary study of the micronucleus test by acridine Orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fisherythropic and embryonic cells. *Wat. Sci. Tech.*, v. 25 nº 11, p. 235-240.

UNESCO. Emerging Pollutants in Water and Wastewater. Disponível em: . Acesso em: 10 jan. 2017

VALDEZ-MORENO, M.; IVANOVA, N.V.; ELÍAS-GUTIÉRREZ, M.; PEDERSEN, S.I.; BESSONOV, K; HEBERT, P.D.N. 2019. Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *PLoS ONE*, 14(4): e0215505.

VALENT, G.U. (1998). Histórico da importância e utilização dos testes de genotoxicidade no Brasil. In: *CONGRESSO DE ECOTOXICOLOGIA*. Itajaí-SC.

VALON, M.; VALBONA, A.; SULA, E.; FAHRI, G. DHURATA, K; FATMIR, C. Histopathologic Biomarker of Fish Liver as Good Bioindicator of Water Pollution in Sitnica River, Kosovo. *Global Journal of Science Frontier, Research Agriculture and Veterinary*.V. 13, p. 40-44, 2013.

VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. 1998. Neotropical Ichthyology: an overview. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Edipucrs, p. 1-11.

VILAR, A.G.; VAN DAM, H.; VAN LOON, E.E.; VONK, J.A.; VAN DER GEEST, H.G. & ADMIRAL, W. 2014. Eutrophication decreases distance decay of similarity in diatom communities. *Freshwater Biology* 59(7): 1522-1531.

VÖRÖSMARTY, C.J.; MCINTYRE, P.B.; GESSNER, M.O.; DUDGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN, P.; GLIDDEN, S.; BUNN, S.E.; SULLIVAN, C.A.; REDY LIERMANN, C. & DAVIES P.M. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467: 555-561.

W.H.O. World Health Organization. (1993). International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva.

WENGRAT, S.; PADIAL, A.A.; JEPPENSEN, E.; DAVIDSON, T.A.; FONTANA, L.; COSTA-BÖDDECKER, S. & BICUDO, D.C. 2017. Paleolimnological records reveal biotic homogenization driven by eutrophication in tropical reservoirs. *Journal of Paleolimnology*, on line first.

WHITE PA, RASMUSSEN JB, BLAISE C. (1996) Comparing the presence, potency, and potencial hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ Mol Mutag*; 27:116-39.

WHITTAKER, R.H. 1960. Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs* 30: 279-338.

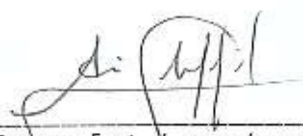
WHITTAKER, R.H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21: 213-251.

ZAGATTO, P.A. 1998. Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade: resultados publicados. In: *CONGRESSO DE ECOTOXICOLOGIA*. Itajaí-SC.

ZENI, T. O.; VICENTRE, A.L.; CASTILHO-VESTPHAL, G. G.; HORODESKY, A.; MONTANHINI, R.; OSTRENSKY, A. Effects of iodized salt on the histopathology of the gills and liver in *Rhamdia quelen* and *Metynnis maculatus*. *Aquaculture Research*, P. 1-11, 2016.

ZORZAL-ALMEIDA, S.; BINI, L.M. & BICUDO, D.C. 2017. Beta diversity of diatoms is driven by environmental heterogeneity, spatial extent and productivity. *Hydrobiologia* 800: 7-16.

28. QUADRO DE ASSINATURAS

ITAIPU BINACIONAL	FPTI-BR
 <i>Data: [19 / 08 / 2020]</i> <i>Dr. Ariel Scheffer da Silva</i> <i>Superintendente MA.CD</i>	<i>(assinado digitalmente)</i> <i>Rolf Massao Satake Gugish</i> <i>Gestor do Projeto – FPTI-BR</i> <i>(assinado digitalmente)</i> <i>Tatiani Marcanzoni</i> <i>Planejamento e Controle - FPTI-BR</i> <i>(assinado digitalmente)</i> <i>Rafael José Deitos</i> <i>Diretor Técnico - FPTI-BR</i>
UNILA	
<i>Data: [___ / ___ / ___]</i> <i>Dr. Gleisson A. Pereira de Brito</i> <i>Reitor - UNILA</i>	

ANEXO 1 – DETALHAMENTO DO CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO FINANCEIRO E ECONÔMICO

1.1.1 PLANO DE APLICAÇÃO DOS RECURSOS FINANCEIROS – ITAIPU BINACIONAL

[illegible]

1.2 CONTRAPARTIDA

UNILA

Espaços

Laboratório de Biologia Molecular

Laboratório de Limnologia

Coleção Científica

Laboratório de Mutagênese e Histologia

Laboratório de Ecologia da Paisagem

Laboratório de Ciências Médicas

Equipamentos

Item	Item	Quantidade	Valor Unitário	Valor total
INVESTIMENTO	Termociclador	03	R\$ 20.000,00	R\$ 60.000,00
	Balança semi analítica	01	R\$ 1.500,00	R\$ 1.500,00
	Vórtex	01	R\$ 800,00	R\$ 800,00
	Centrífuga mini spin	01	R\$ 1.200,00	R\$ 1.200,00
	Banho seco	01	R\$ 1.200,00	R\$ 1.200,00
	Aagitador magnético	01	R\$ 1.200,00	R\$ 1.200,00
	Centrífuga refrigerada	01	R\$ 35.000,00	R\$ 35.000,00
	Centrífuga microtubos	01	R\$ 20.000,00	R\$ 20.000,00
	Autoclave	01	R\$ 10.000,00	R\$ 10.000,00
	Fonte de eletroforese	03	R\$ 3.500,00	R\$ 10.500,00
	Cuba de eletroforese horizontal	03	R\$ 1.600,00	R\$ 4.800,00
	Cuba de eletroforese vertical	01	R\$ 3.200,00	R\$ 3.200,00
	Micro-ondas	01	R\$ 400,00	R\$ 400,00
	Capela	01	R\$ 4.000,00	R\$ 4.000,00
	Geladeiras	02	R\$ 2.000,00	R\$ 4.000,00
	Freezer -80	01	R\$ 70.000,00	R\$ 70.000,00
	Microscópio com captura de imagens	01	R\$ 150.000,00	R\$ 150.000,00
	Microscópios ópticos	03	R\$ 50.000,00	R\$ 150.000,00
	Lupas	06	R\$ 5.000,00	R\$ 30.000,00
	Estufa	01	R\$ 3.000,00	R\$ 3.000,00
	Sonda multiparâmetros Horiba	01	R\$ 25.000,00	R\$ 25.000,00
	Sequenciador de DNA	01	R\$ 600.000,00	R\$ 600.000,00

	ABI3500			
	Cromatógrafo GC-MS	01	R\$500.000,00	R\$500.000,00
	Cromatógrafo HPLC-DAD	01	R\$200.000,00	R\$200.000,00
	Cromatógrafo GC-FID	01	R\$100.000,00	R\$100.000,00
	Purificador de água ultrapura	01	R\$30.000,00	R\$30.000,00
	TOTAL			R\$2.015.800,00

FPTI-BR

A contrapartida econômica da FPTI-BR corresponde à utilização dos equipamentos listados no Quadro a seguir:

Item	Equipamento	Qde	Valor unitário	Valor total
INVESTIMENTO	Destilador de Nitrogênio (BP 021511)	01	R\$2.778,26	R\$2.778,26
	Controlador de temperatura (BPV000457)	01	R\$826,69	R\$826,69
	Agitador magnético com aquecimento (BPV000456)	01	R\$2.005,89	R\$2.005,89
	Sistema manual de extração e pré-concentração de amostras (Manifold) (BP 021512)	01	R\$2.320,04	R\$2.320,04
	Shaker - Mesa agitadora orbital (BP 022779)	01	R\$4.095,64	R\$4.095,64
	Concentrador de amostras (BP 023409)	01	R\$2.999,69	R\$2.999,69
	Chapa de aquecimento (BP 024900)	01	R\$1.062,88	R\$1.062,88
	Agitador magnético c/ aquecimento e display digital (BP 24904)	01	R\$2.196,62	R\$2.196,62
	Dispersador + haste (BP 024902 Haste 024903)	01	R\$7.373,21	R\$7.373,21
	pHmetro de bancada multiparametro (BP 024901)	01	R\$13.787,39	R\$13.787,39
	Bloco microdigestor de Kjeldahl microprocessado (BP 021551)	01	R\$2.066,72	R\$2.066,72
	Agitador para tubos tipo Vortex (BPV000391 e BPV000392)	02	R\$1.776,43	R\$3.552,86
	TOTAL			R\$45.065,89

Além disso, para atender as necessidades administrativas do projeto, a FPTI-BR disponibilizará a sua estrutura organizacional, que compreende:

- Gestão de compras e licitações – apoiará o projeto nas questões ligadas a compras, despesas de viagens e de contratos com os fornecedores;

- Jurídica – gestão de contratos com os fornecedores;
- Infraestrutura, segurança e serviços – proverá infraestrutura da FPTI-BR, necessária para instalação das equipes e dos equipamentos que serão utilizados pelo projeto e, viabilizará a utilização dos espaços rotativos, como salas de reuniões, videoconferências etc.
- Planejamento e controle – atuará junto ao gerente e a equipe do projeto para que o mesmo seja conduzido segundo a metodologia de gerenciamento de projetos do PMI (*Project Management Institute*).

Item	Área gestora	Descrição	Critério de rateio	Custo Unitário Mensal	Total p/ o período do Projeto
Custelo	Custo com apoio das áreas (mensal fixo)	IGT - Taxa de ocupação espaço no PTI	m²	R\$ 1.168,54	R\$ 34.766,20
		IGT - Depreciação de equipamentos	Horas de utilização	R\$ 1.048,02	R\$ 31.440,60
		Planejamento e Controle	Hora técnica/ mensal	R\$ 680,00	R\$ 20.400,00
		Infraestrutura, Segurança e Serviços	m²	R\$ 17,60	R\$ 626,00
		Infraestrutura, Segurança e Serviços	Unidade/ demanda	R\$ 13,35	R\$ 400,50
		Tecnologia da Informação e Comunicação	m²	R\$ 454,82	R\$ 13.638,60
		Gestão de Pessoas	Unidade (funcionário)	R\$ 1.880,28	R\$ 56.808,70
		Gestão Econômica Financeira	Linear	R\$ 385,86	R\$ 11.675,80
		Gestão Econômica Financeira	Unidade	R\$ 766,63	R\$ 22.968,90
	Área gestora	Gastos de acordo com a estimativa de demanda durante a execução do Projeto	Critério de rateio	Custo Unitário	Total p/ o período do Projeto
Custelo	Infraestrutura, segurança e serviços	Serviço da Central de Veículos	Km rodado	R\$ 1,81	R\$ 6.616,00
		Serviço de apoio a viagens	Unidade	R\$ 124,58	R\$ 44.848,80
		Serviços de protocolo	Unidade	R\$ 12,12	R\$ 436,32
		Serviços de copa	Unidade	R\$ 22,79	R\$ 16.408,80
		Serviço de coffee break	Unidade	R\$ 6,27	R\$ 1.604,80
		Serviço de planejamento de projetos (layout)	Hora técnica	R\$ 70,61	R\$ 2.820,40
	Tecnologia da Informação e Comunicação	Serviços de service desk/ atas de registro de preços	Unidade	R\$ 266,06	R\$ 5.301,00
	Compras e Licitações	Serviços de compras diretas	Unidade	R\$ 487,40	R\$ 9.748,00
		Serviço de compra de pequeno valor	Unidade	R\$ 254,71	R\$ 2.547,10
		Serviços de licitação	Unidade	R\$ 4.282,16	R\$ 21.460,76
		Publicação de editais de licitação	Unidade	R\$ 66,00	R\$ 330,00
		Serviços de importações	Unidade	R\$ 1.909,77	R\$ 19.097,70
	Jurídica	Serviços consultivos	Unidade	R\$ 404,66	R\$ 2.022,80
		Serviços de gestão de contratos	Unidade	R\$ 393,13	R\$ 1.965,65
	Gestão Econômica e Financeira	Serviço de análise de custos	Hora técnica	R\$ 42,19	R\$ 126,67
	Comunicação e Marketing	Serviço de apoio a eventos	Diária	R\$ 347,98	R\$ 2.087,88
	Planejamento e Controle	Serviços de análises/ apoio na metodologia de gerenciamento de projetos	Unidade	R\$ 726,55	R\$ 726,55
TOTAL					R\$ 329.462,42

¹ Os valores acima mencionados se referem apenas a uma memória de cálculo estimada, podendo haver alterações durante a execução do projeto.

j.l

PROTOCOLO DE ASSINATURA(S)

O documento acima foi proposto para assinatura digital na plataforma Portal de Assinaturas Certisign. Para verificar as assinaturas clique no link: <https://www.portaldeassinaturas.com.br/Verificar/95FB-9F8F-7F1A-C431> ou vá até o site <https://www.portaldeassinaturas.com.br:443> e utilize o código abaixo para verificar se este documento é válido.

Código para verificação: 95FB-9F8F-7F1A-C431



Hash do Documento

BB230DD379CE607E2F5FC0CEABBA77ED55DE7CA062885CD68BCEC456DA8964E5

O(s) nome(s) indicado(s) para assinatura, bem como seu(s) status em 19/08/2020 é(são) :

☒ Rafael Jose Deitos - 049. [REDACTED]-74 em 19/08/2020 08:46 UTC-03:00

Tipo: Certificado Digital

☒ Rolf Massao Satake Gugisch (Signatário) - 044. [REDACTED]-33 em 17/08/2020 16:56 UTC-03:00

Tipo: Certificado Digital

☒ Tatiani Marcanzoni Lamb - 049. [REDACTED]-50 em 17/08/2020 16:33 UTC-03:00

Tipo: Certificado Digital



2:1

Assinado digitalmente por
Anatalicio Ridsen Junior
Data: 24/09/2020
19:16:48 -03:00

Assinado digitalmente por
Vanessa de Oliveira
Penteado Pereira
Data: 25/09/2020
07:49:59 -03:00

Assinado digitalmente por
RAFAEL JOSE DEITOS
Data: 25/09/2020
10:23:23 -03:00

Assinado digitalmente
por Tais Sobral Bernardi
Data: 28/09/2020
16:31:24 -03:00

Assinado digitalmente por
EDUARDO CASTANHEIRA
GARRIDO ALVES
Data: 15/10/2020 15:50:45 -
03:00

Assinado digitalmente por
GLEISSON ALISSON
PEREIRA DE BRITO
Data 11/11/2020 10:17:55 -
03:00