

CE 05/2024-GHID

**INSTRUMENTO PARTICULAR DE CONVÊNIO E
COOPERAÇÃO TÉCNICA E FINANCEIRA (TCTF)
QUE ENTRE SI CELEBRAM A COMPANHIA DE
SANEAMENTO DO PARANÁ – SANEPAR E A
ATGC GENÉTICA AMBIENTAL LTDA.**

A COMPANHIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ – SANEPAR, sociedade de economia mista sob controle do Estado do Paraná, constituída pela Lei nº 4674, de 23 de janeiro de 1963, com sede na Rua Engenheiros Rebouças, nº 1376, em Curitiba-PR, inscrita no CNPJ/MF sob nº 76.484.013/0001-45, doravante denominada SANEPAR representada neste ato por seu Diretor Presidente CLAUDIO STABILE, portador do RG nº 6.034.845-6 e do CPF nº 577.789.229-91, e seu Diretor de Meio Ambiente e Ação Social JULIO CESAR GONCHOROSKY, portador do RG nº 1.611.105-8 e do CPF nº 401.671.229-91 e na qualidade de CONVENIADA, ATGC, pessoa jurídica ATGC GENÉTICA AMBIENTAL LTDA, com sede à R. MARECHAL ANOR TEIXEIRA DOS SANTOS - Nº: 000850 RESIDÊNCIA 14 do município de Curitiba, Estado do Paraná: inscrita no CNPJ/MF sob nº. 35.635.462/0001-60 representada pelo seu Diretor Comercial e Financeiro OTTO SAMUEL MADER NETO, portador da cédula de identidade nº.6.240.896-0 CPF nº 037.427.079-14, instituições em conjunto denominadas PARTES, celebram o presente Termo de Cooperação Técnica e Convênio, de acordo com a Lei nº8.666 de 21/06/1993 e suas alterações, Lei 13.019 de 31 de julho de 2014, Lei 13.303 de 30 de junho de 2016, no âmbito federal, e a Lei Estadual nº 15.608 de 16 de agosto de 2007, com o Regulamento Interno de Licitações, Contratos e Convênios da Sanepar publicado em 16 de março de 2017 e com vigência a partir de 1º de maio de 2017 aplicáveis no que couber e em conformidade com as condições estabelecidas nas seguintes cláusulas:

DECLARAÇÕES

I – As Partes declaram que:

A **Sanepar** e a **ATGC**, buscam envidar esforços e competências para a execução de atividades de pesquisa e desenvolvimento, absorção e transferência de tecnologias, aplicação de soluções tecnológicas e utilização de infraestrutura e sistemas instrumentais necessários, no âmbito dos requisitos para execução do Plano de Segurança Hídrica do Estado do Paraná pela SANEPAR.

As Partes concordam que deverão disponibilizar instrumentos, projetos e documentos que visem orientar e informar o desenvolvimento das atividades e recomendar as ações necessárias para alcançar os objetivos pretendidos pela presente Cooperação Técnica.

O presente Termo de Cooperação Técnica tem como premissa o desenvolvimento, adaptação e implementação de ferramentas metodológicas definidas pelo Plano de Segurança da Água (PSA), para mapeamento, avaliação e gerenciamento de riscos de relacionados à qualidade das águas (in natura) captadas pela Sanepar, em atendimento à Portaria Consolidação nº 5, do Ministério da Saúde.

Justifica-se o presente Termo de Cooperação Técnica em função de que metas e resultados pretendidos que são análises de riscos relacionados a saúde da população e aos perigos biológicos associados a doenças relacionadas com a água.

CLÁUSULA PRIMEIRA – DO OBJETO

O presente CONVÊNIO tem por finalidade a cooperação da SANEPAR com a CONVENIADA para o “Desenvolvimento de ferramentas metodológicas para monitoramento biológico dos mananciais utilizados pela Companhia, através do uso de DNA ambiental e sequenciamento molecular (*metabarcoding*) de acordo com o plano de trabalho – Anexo I.

Parágrafo único. Para atingir o objeto conveniado, os partícipes obrigam-se a cumprir fielmente o Plano de Trabalho e as regras constantes dos Planos acima mencionados, os quais passam a integrar este Convênio, independentemente de sua transcrição.

CLÁUSULA SEGUNDA – DAS OBRIGAÇÕES DA SANEPAR

- I. Repassar à **ATGC** os recursos financeiros correspondentes à sua participação nas despesas pertinentes à execução do objeto, em conformidade com o consignado no Cronograma de Desembolso do Plano de Trabalho, desde que apresentada a documentação estabelecida na Cláusula Sétima deste ajuste;
- II. Promover o acompanhamento e o ateste da execução do objeto do presente Convênio, assim como da regular aplicação das parcelas de recursos destinados ao repasse relacionados ao plano de trabalho, cujas medições serão de responsabilidade da SANEPAR, a quem competirá remeter de imediato a respectiva documentação à **ATGC**;
- III. Solicitar informações à **ATGC** bem como interpelar, no que diz respeito ao cumprimento do objeto do Convênio;
- IV. Disponibilizar profissionais técnicos de diversas especialidades do quadro da Companhia para o apoio técnico necessário para consecução dos objetivos pretendidos na presente cooperação técnica;
- V. Participar de reuniões periódicas de avaliação da execução deste Termo;
- VI. Realizar as devidas contratações, execução, fiscalização das metas e outros elementos gerados, previstos no Plano de Trabalho;
- VII. Acompanhar e avaliar a aplicação dos recursos objeto do presente Acordo de Cooperação Técnica e Financeira por meio do Sistema Integrado de Transferência do Tribunal de Contas do Paraná – SIT/TCEPR.
- VIII. Publicar o extrato de convênio e os de eventuais aditamentos na imprensa oficial estadual;
- IX. Analisar e, se for o caso, aprovar, excepcionalmente, a proposta de reformulação do Plano de Trabalho, acompanhada de justificativa, desde que não implique em alteração do objeto e encaminhada com a antecedência mínima de 60 (sessenta) dias, contados da data fixada para o término do ajuste;
- X. Notificar a **ATGC** para que proceda à apresentação da prestação de contas dos recursos aplicados quando não houver sido apresentada no prazo legal ou quando constatada a má aplicação dos recursos públicos, objeto da transferência voluntária, instaurando, em caso de omissão, a devida Tomada de Contas Especial, em prazo não excedente a 30 (trinta) dias;
- XI. Comunicar expressamente à **ATGC** sobre quaisquer irregularidades decorrentes do uso dos recursos relativos a este Convênio ou outras pendências de ordem técnica, que não poderá ser superior a 20 (vinte) dias, prorrogável por igual período;
- XII. Na hipótese de não ser obtida a satisfação das pendências de que trata a alínea precedente, apurar eventuais danos e comunicar o fato à **ATGC**, para que promova o ressarcimento do valor apurado, sob pena de imediata instauração de Tomada de Contas Especial;
- XIII. Encaminhar a prestação de contas na forma e prazos fixados por normativa do Tribunal de Contas do Estado do Paraná;
- XIV. Vetar pagamentos antecipados ou adiantamentos por fornecimento de bens ou serviços ainda não entregues ou não executados, com recursos do Convênio;

CLÁUSULA TERCEIRA – DAS OBRIGAÇÕES DA ATGC

- I. Disponibilizar resultados e produtos por meio de relatórios técnicos, e/ou relatórios complementares, quando necessário, sendo estes analíticos dos parâmetros biológicos que se mostrarem relevantes face aos riscos à saúde para cada manancial para consecução dos objetivos pretendidos no presente Termo de Cooperação Técnica;
- II. Participar de reuniões periódicas de avaliação da execução deste Termo;
- III. Realizar análises biológicas das amostras de águas superficiais, coletadas, filtradas, fixadas e encaminhadas pela SANEPAR, conforme Plano de Trabalho;
- IV. Analisar, descrever e interpretar os dados das análises biológicas realizadas nas amostras coletadas, filtradas, fixadas e encaminhadas pelas SANEPAR nos mananciais e/ou reservatórios de interesse da Contratante;
- V. Além das amostras que serão analisadas através de metabarcoding, deverão ser coletadas mais 1.088 amostras, que não serão extraídas, sequenciadas ou analisadas, mas sim usadas para compor um banco de amostras que serão mantidas congeladas em freezer a - 80 °C durante cinco anos nessa condição de temperatura. Após os cinco anos, as amostras de DNA que não foram utilizadas serão descartadas de acordo com a regulamentação seguida pela ATGC que atende ao preconizado pelo Governo Federal.
- VI. Fornecer resultados das análises de DNA ambiental coletadas para avaliar a biodiversidade aquática e possíveis desequilíbrios ambientais que possam comprometer a segurança do abastecimento público.
- VII. Empregar os recursos exclusivamente para o cumprimento dos objetivos estabelecidos pelo Termo de Transferência;
- VIII. Garantir o livre acesso, a qualquer tempo, dos servidores dos sistemas de controle interno e externo a todos os atos, fatos e documentos relacionados direta ou indiretamente com o instrumento pactuado;
- IX. Atender às recomendações, exigências e determinações da **SANEPAR** e dos agentes dos sistemas de controle interno e externo;
- X. Prestar contas das importâncias que lhe forem repassadas, destinados à execução do objeto pactuado, diretamente à **SANEPAR** para apresentação ao TCEPR, em consonância com a legislação aplicável à espécie;
- XI. Comprovar tempestivamente, junto a **SANEPAR**, a utilização apropriada dos recursos que lhe forem repassados;
- XII. Restituir o eventual saldo de recursos a Sanepar, na conclusão, extinção, denúncia ou rescisão do presente convênio;
- XIII. Utilizar os recursos financeiros em conformidade com os procedimentos legais, em especial com observância ao estabelecido na Lei Federal nº 8.666/1993 e na Lei Estadual nº 15.608/2007 e Resolução nº 28/2011 do TCEPR, no que diz respeito às aquisições, execução de obras e prestação de serviços por terceiros, mediante via de regra, pela competente licitação;
- XIV. Nas hipóteses de dispensa ou inexigibilidade de licitação previstos nos artigos 33 e 34 da Lei Estadual nº 15.608/2007, deverá ser atentado o disposto no parágrafo 2º, do art. 35, da aludida Lei;
- XV. Responsabilizar-se por todo o pessoal envolvido na execução dos serviços, bem como pelos encargos decorrentes da execução do objeto conveniado, inclusive trabalhista,

previdenciário, social, fiscal e comercial, não gerando a **SANEPAR** obrigações ou outros encargos de qualquer natureza;

- XVI. Propiciar à **SANEPAR** todos os meios e condições necessários ao controle, supervisão e acompanhamento, inclusive permitindo-lhe inspeções *in loco*, fornecendo as informações e documentos relacionados com a execução do objeto deste instrumento, sempre que solicitado;
- XVII. Solicitar a prorrogação do prazo para execução do objeto conveniado, mediante Termo Aditivo;
- XVIII. Manter cadastro atualizado junto ao TCE/PR do(s) gestor(es) e servidor(es) encarregados da fiscalização do ato de transferência;
- XIX. Preservar todos os documentos originais relacionados ao presente convênio em local seguro e em bom estado de conservação, mantendo-os à disposição do TCE/PR por um prazo de 10 (dez) anos contados do encerramento do processo de prestação de contas, nos termos do art. 398 do Regimento Interno do TCE/PR;
- XX. Prestar contas dos recursos repassados pela SANEPAR por meio do Sistema Integrado de Transferência do Tribunal de Contas do Paraná – SIT/TCEPR;
- XXI. Incorporar ao patrimônio da **ATGC**, os bens adquiridos no âmbito do projeto, desde sua aquisição, observada a destinação prevista no Plano de Trabalho.

CLÁUSULA QUARTA – OBRIGAÇÕES CONJUNTAS

Para o adequado cumprimento do objeto estabelecido na cláusula primeira do presente Termo de Cooperação Técnica - TCT, as **PARTES** se obrigam:

- I. À fiscalização dos trabalhos em campo e, se necessário, a revisão do Plano de Trabalho, parte integrante deste instrumento;
- II. As responsabilidades dos partícipes são limitadas exclusivamente às obrigações contraídas durante o presente TCT, cada qual assumindo e respondendo pelos encargos legais, contratuais e trabalhistas decorrentes da realização do objeto deste instrumento em relação aos seus servidores, não havendo responsabilidade solidária;
- III. As entidades partícipes estabelecem que as despesas de custeio no desenvolvimento das atividades são de responsabilidade de cada entidade, não cabendo ressarcimento, à que título for, de uma parte à outra, na realização do objeto;
- IV. O pessoal utilizado por qualquer das partes, para a execução do objeto deste Termo, na condição de empregado, autônomo, profissional visitante, empreiteiro ou a qualquer título, não terá nenhuma vinculação com a outra parte, ficando a cargo exclusivo da parte que o contratou, a responsabilidade integral no que se refere a todos os direitos, mormente os trabalhistas e previdenciários, inexistindo qualquer solidariedade entre as partes.

CLÁUSULA QUINTA – DA COORDENAÇÃO E FISCALIZAÇÃO

- I. Dentro do escopo deste TCT, todas as ações a serem desenvolvidas entre as instituições acordantes, em qualquer dos níveis de atuação, serão coordenadas pelos representantes de cada uma das **PARTES**, a serem indicados para cada ação a ser desenvolvida, conforme definido no Plano de Trabalho;
- II. Os coordenadores, além da representatividade institucional, terão como competência precípua, a coordenação das atividades internas a sua Instituição, necessárias ao desenvolvimento do Plano de Trabalho, fazendo a articulação entre as áreas executoras e provendo cada Plano de Trabalho, necessário à sua progressão;
- III. São funções dos Coordenadores também, a análise, identificação e o estabelecimento de normas e procedimentos técnicos, financeiros e legais requeridos para o desenvolvimento de cada Plano de Trabalho;
- IV. Deverão ainda, os Coordenadores em conjunto, elaborar relatórios trimestrais referente às atividades objeto do Plano de Trabalho, além de um Relatório Final de Projeto.
- V. A fiscalização e a supervisão do ajuste pela **SANEPAR** serão instrumentalizadas mediante os seguintes documentos:

a) Termo de Acompanhamento e Fiscalização, emitido por ocasião da averiguação *in loco* da autoridade competente e, consistente de relatório pormenorizado no qual serão anotados as ocorrências e os resultados de qualquer verificação sobre as atividades desenvolvidas como também as condições em que se encontra a execução do objeto. O referido Termo será expedido mensalmente ou sempre que houver intervenção do fiscal responsável, consoante avaliação técnica ou determinação de autoridade superior;

b) Certificado de Compatibilidade Físico-Financeira, emitido na hipótese de não ter sido concluído o objeto, especificando a proporção de execução e de inexecução do objeto;

c) Certificado de Cumprimento dos Objetivos, pelo qual a **SANEPAR** certificará motivadamente o cumprimento do objeto da parceria nos termos ajustados, expedido quando constatada a efetivação, de modo estável, rotineiro, com identificados resultados percebidos e verificáveis do atingimento do interesse público.

Parágrafo Único. Nos termos do art. 137, inc. IV, da Lei nº 15.608/2007 e no art. 20 e seguintes da Resolução nº 28/2011 do TCEPR, atuará como Fiscal do Convênio a funcionária Adriana de Souza Trigo, RG: 7.850.707-1, CPF: 035.989.139-07, que ficará responsável pelo

acompanhamento e fiscalização do valor repassado. E da execução do respectivo objeto o gestor do contrato será o funcionário Raul Alberto Marcon RG: 5.167.284-4 SESP-PR e CPF: 977.627.179-00.

Parágrafo segundo. O órgão de Controle Interno da **SANEPAR**, no exercício dos deveres de acompanhamento e fiscalização, a qualquer tempo poderá emitir relatório circunstanciado sobre a execução do objeto da transferência, discorrendo sobre o histórico do acompanhamento da execução, de eventuais suspensões e medidas saneadoras, manifestando-se, conclusivamente, sobre a regularidade da aplicação do recurso consoante objetivos, metas, observância das normas legais e cláusulas avençadas, qualidade do serviço executado e avaliação das metas e dos resultados estabelecidos mediante comparativo analítico entre situação anterior e posteriores à celebração do termo.

Parágrafo terceiro. A **SANEPAR** e a **ATGC** comprometem-se, em ato prévio, condição à efetivação da transferência do recurso financeiro, a registrar e manter cadastro atualizado no Sistema Integrado de Transferência – SIT disponibilizado pelo TCE/PR dos gestores e servidores encarregados da fiscalização do ato de transferência.

CLÁUSULA SEXTA – PRAZOS, APORTES E REPASSES DE RECURSOS

Para a execução do objeto deste Termo de Cooperação e Convênio, os recursos e aportes necessários somam o valor total de **R\$ 4.099.754,00 (quatro milhões, noventa e nove mil, setessentos e cinquenta e quatro reais)**, com vigência de 36 meses, conforme estabelecido no Plano de Trabalho e parte integrante do presente instrumento.

Parágrafo Primeiro Cabe à **SANEPAR** destinar à **ATGC** a importância de **R\$ 4.099.754,00 (quatro milhões, noventa e nove mil, setessentos e cinquenta e quatro reais)** como contrapartida financeira, conforme estabelecido no Plano de Trabalho e parte integrante do presente instrumento,

Parágrafo Segundo. As contrapartidas econômicas de ambos os partícipes, **em serviços**, restam aferidas na forma explicitada no Plano de Trabalho.

Parágrafo Terceiro. A movimentação da conta bancária dar-se-á exclusivamente ao atendimento das despesas decorrentes da realização do objeto, processada por meio de ordens de pagamento para contas correntes dos fornecedores ou contratados ou, na eventualidade de não possuírem, por meio de cheques nominais ou outro meio hábil à comprovação do destinatário do recurso financeiro.

Parágrafo Quarto. O montante financeiro repassado não poderá ser aumentado, salvo quando houver ampliação do objeto capaz de justificá-lo, formalizada mediante aditivo e condicionada à apresentação e prévia aprovação de detalhado projeto adicional à comprovação da execução das etapas anteriores.

Parágrafo Quinto. A efetiva liberação do recurso financeiro está condicionada à apresentação, pela **ATGC**, dos seguintes documentos e certidões, atualizadas e vigentes:

- I. Certidão de Regularidade de Tributos Federais e Dívida Ativa da União e Contribuição Previdenciária (art.136, inc. IV, da Lei Estadual nº 15.608/2007);
- II. Certidão de Regularidade de Tributos Estaduais (art.136, inc. IV, da Lei Estadual nº 15.608/2007);
- III. Certificado de Regularidade de Situação do FGTS (art.136, inc. IV, da Lei Estadual nº 15.608/2007);

IV. Certidão Negativa para Transferências Voluntárias (art. 25,§ 1º,IV, “a”, da Lei Complementar 101/2000);

V. Certidão Negativa de Débito Trabalhista (art.3º, inc. X, da Instrução Normativa 61/2011 do TCEPR)

Parágrafo Sexto. Os valores que forem repassados pela **SANEPAR** deverão ser depositados no prazo de 24 (vinte e quatro) horas, contadas de seu recebimento, na agência local do Banco: Caixa Econômica Federal, onde ficarão mantidos em conta especial, vinculada ao presente Convênio;

Parágrafo Sétimo. Caso a previsão de utilização dos recursos referidos no *caput* desta Cláusula seja igual ou superior a 30 (trinta) dias, o valor repassado à **ATGC**, deverá ser aplicado em conta de caderneta de poupança junto à instituição financeira acima mencionada;

Parágrafo Oitavo. A movimentação da conta bancária destinar-se-á exclusivamente ao atendimento de despesas com a execução do objeto do ajuste e será feita mediante a emissão de cheques nominais e/ou ordens de pagamento.

CLÁUSULA SETIMA – REPRESENTANTES LEGAIS DAS PARTES

As **PARTES** concordam em designar representantes que poderão firmar indistintamente os Termos de Cooperação Técnica Específica dentro do âmbito de suas respectivas competências e contarão com as faculdades suficientes para tomar decisões relacionadas ao cumprimento dos planos de trabalho.

A pessoa com competência e habilitação para representar a **SANEPAR** será o seu Diretor Presidente ou a que estiver em exercício do cargo de Diretor Presidente, hoje o Sr. **Cláudio**

Stabile, juntamente com o Diretor de Meio ambiente e Ação social, hoje representado pelo Sr. **Júlio César Gonchorosky**.

A pessoa com competência e habilitação para a **ATGC** será o seu Diretor Comercial e Financeiro, o Engenheiro **Otto Samuel Mader Neto**.

CLÁUSULA OITAVA – DA VIGÊNCIA

O presente TCT tem vigência de 36 (trinta e seis) meses, contados da data de sua assinatura, que pode ser alterada mediante solicitação de qualquer um parceiro, devidamente formalizada e justificada, a ser apresentada à **SANEPAR** em, no mínimo, 60 (sessenta) dias antes do termo inicialmente previsto, não sendo possível a sua prorrogação em razão do limite temporal previsto no artigo 79 do Decreto Estadual nº 3.513/2016.

O TCT somente produzirá efeitos jurídicos após a publicação do respectivo extrato no Diário Oficial do Estado do Paraná.

O TCT poderá ser denunciado a qualquer tempo por qualquer das partes, desde que se manifeste sua intenção em fazê-lo com antecedência de 60 (sessenta) dias, nos termos do inciso XVI do art. 42 da Lei Federal 13.019/2014.

Na ocorrência de denúncia, a **SANEPAR** e a **ATGC** permanecerão responsáveis pelas obrigações e auferirão as vantagens relativas ao período.

CLÁUSULA NONA – DA RELAÇÃO COM OUTROS CONVÊNIOS

Este instrumento não invalida outros convênios e termos similares, celebrados entre as **PARTES**, ainda vigentes.

CLÁUSULA DÉCIMA – DA RESCISÃO

Este ajuste poderá ser denunciado, formalmente, a qualquer tempo, e rescindido de pleno direito, independentemente de interpelação judicial ou extrajudicial, por inexecução das normas preconizadas na legislação vigente, por inexecução de quaisquer de suas cláusulas ou condições, ou pela superveniência de norma legal ou de fato que o torne material ou formalmente inexecutável, sem quaisquer ônus advindos dessa medida, impingindo aos partícipes as responsabilidades das obrigações oriundas do prazo que esteve vigente.

Parágrafo único. Constitui motivo para rescisão deste Convênio a inexecução das cláusulas firmadas, em especial, quando constatadas as seguintes situações:

- a) a utilização dos recursos em desacordo com o Plano de Trabalho;
- b) a constatação, a qualquer tempo, de falsidade ou incorreção de informação em qualquer documento apresentado ou de irregularidade de natureza grave, no decorrer da fiscalização ou auditoria necessária;
- c) a ausência de Prestação de Contas Final no prazo legal, ou de Prestações de Contas Parciais, quando solicitadas pela **SANEPAR**.
- d) a verificação de qualquer circunstância que enseje a instauração de tomada de contas especial;
- e) a aplicação dos recursos financeiros, afetos a este Convênio, no mercado financeiro em desacordo com a legislação vigente.

CLÁUSULA DÉCIMA PRIMEIRA – DAS ALTERAÇÕES

- a) Eventuais alterações no plano de trabalho, que venham a ampliar ou reduzir o escopo do trabalho, serão realizadas mediante acordo entre as partes, desde que não altere o valor global do Convênio, formalizados por carta ou ofício.
- b) Alterações no plano de trabalho que impactam o valor global ou do objeto do projeto serão realizadas mediante termo aditivo ao presente convênio mediante acordo entre as partes.

CLÁUSULA DÉCIMA SEGUNDA – DAS COMUNICAÇÕES ENTRE OS PARTÍCIPES

Todas as comunicações, entre os partícipes, deverão ser feitas por escrito e protocoladas:

- a) Quando dirigidas à **SANEPAR** deverão ser encaminhadas a Diretoria de Meio Ambiente, aos cuidados da Gerência de Recursos Hídricos - GHID;
- b) Quando dirigidas à **ATGC** deverão ser endereçadas à Rua Marechal Anor Teixeira dos Santos, nº 850 - casa 14, Condomínio Villaggio del Sole C, CEP 82650-120 - Curitiba - PR, conforme citado no preâmbulo deste termo.

CLÁUSULA DÉCIMA TERCEIRA – CONTROVÉRSIAS E INTERPRETAÇÃO

As **PARTES** concordam que o presente TCT é produto de boa-fé, pelo que toda controvérsia e interpretação que se derive do mesmo, quanto a sua operação, formalização e cumprimento, serão resolvidos em comum acordo.

CLÁUSULA DÉCIMA QUARTA – DA PUBLICAÇÃO

A publicação resumida deste instrumento deverá ser efetivada pelas **PARTES**, conforme dispõe o Parágrafo Único do Art. 61 da Lei nº 8.666/93, no Diário Oficial do Estado do Paraná.

CLÁUSULA DÉCIMA QUINTA – DO FORO

Para dirimir quaisquer dúvidas ou questões oriundas deste TCT, que não possam ser solucionadas por entendimento direto entre as **PARTES**, o foro competente é o da Justiça Estadual do Paraná, Comarca e Circunscrição de Curitiba – PR, Brasil.

E por estarem assim acordados, as **PARTES** assinam o presente Termo de Cooperação Técnica em 3 (três) vias, igualmente válida e de mesmo teor, tendo todas as versões à mesma validade legal.

Curitiba, 15 de março de 2024.

OTTO SAMUEL
MADER

NETTO:03742707914

Assinado de forma digital por
OTTO SAMUEL MADER
NETTO:03742707914
Dados: 2024.04.02 14:46:49
-03'00'

CLÁUDIO STABILE

Diretor Presidente - SANEPAR

Otto Samuel Mader Neto

Diretor Comercial e Financeiro - ATGC

JULIO CESAR GONCHOROSKY

Diretor Meio Ambiente e Ação Social - SANEPAR

Testemunhas:

Nome e CPF

Nome e CPF

Plano de Trabalho

CHAMAMENTO PÚBLICO Nº 001/2023 GHID



1.1 Introdução

A água, fonte vital para a sobrevivência humana e para o equilíbrio dos ecossistemas, é um recurso finito e vulnerável (Mitchell 2019). O acesso a água limpa e potável, por sua vez, não é apenas uma necessidade básica, mas também um direito humano fundamental (Schroering 2019, Reiners 2021). Por isso, em um mundo com demanda crescente por água potável – estima-se que nos últimos 100 anos a demanda global por água tenha aumentado em mais de 600% (Boretti and Rosa 2019) - a segurança e eficácia dos sistemas de abastecimento se tornam primordiais. Neste cenário, um entendimento profundo dos mananciais de abastecimento e sua biodiversidade é crucial, assim como a identificação e gerenciamento de riscos associados a estes sistemas (Tzanakakis, Paranychianakis et al. 2020, Nova 2023). Afinal, a relevância do sistema de abastecimento não reside apenas na distribuição contínua de água, mas, principalmente, na garantia de sua qualidade e segurança para o consumidor residencial ou industrial (Zhou, Zhang et al. 2013, Winkler 2017).

Nesse sentido, os eventos e perigos biológicos são um dos principais desafios para a qualidade da água (Abel 2002, Cairns 2017). Eles podem estar associados a uma grande variedade de fatores, mas quase sempre estão ligados a duas fontes principais: a) A poluição da água, que pode ser causada por esgotos domésticos e industriais, agrotóxicos e fertilizantes (Singh, Yadav et al. 2020). A poluição e a subsequente eutrofização da água podem levar à proliferação de bactérias, algas e protistas que podem causar problemas à saúde humana. b) As mudanças climáticas, que estão levando a um aumento na frequência e intensidade de eventos extremos, como chuvas intensas, inundações ou secas severas (Manisalidis, Stavropoulou et al. 2020, Woolway, Kraemer et al. 2020). Esses eventos, por sua vez, podem levar ao aumento da contaminação da água por esgotos ou outros poluentes.

Um sistema robusto e resiliente de tratamento de água, como todos desejam, deve, portanto, ter o poder não só de fornecer água, mas também de monitorar, de forma mais rápida, integrada e eficiente possível, a presença de qualquer risco ou deficiência em toda a sua extensão - desde a bacia de manancial, passando pelas estações de tratamento, até chegar à torneira do consumidor (Rani and Chang 2021,

Talat 2021, Richards, Tzachor et al. 2023). Assim os sistemas de monitoramento e alerta a serem implantados precisam idealmente:

- Garantir a qualidade: No cerne deste projeto está a necessidade de garantir água de "qualidade certificada" para os consumidores. Esta garantia envolve não apenas a eliminação de contaminações e riscos, mas também a confirmação de que a água fornecida é saudável e adequada ao consumo.
- Prevenir contaminações: A detecção, o mais rapidamente possível de contaminantes biológicos, químicos ou físicos pode evitar surtos de doenças, garantindo a saúde e o bem-estar da população.
- Apresentar respostas rápidas em casos de incidentes: em caso de eventos climáticos intensos, como inundações ou secas, ou mesmo de eventos imprevistos, como o crescimento anormal de populações de agentes biológicos na água dos reservatórios, um sistema de monitoramento e resolução de riscos que seja resiliente pode agir rapidamente, fornecendo informações para que sejam minimizados os impactos negativos.
- Gerenciar de forma eficiente os recursos: Ao identificar deficiências ou riscos ao sistema, é possível otimizar o uso da água, evitando seu desperdício e garantindo seu fornecimento contínuo, mesmo em períodos de escassez.
- Proteger o ecossistema: Ao monitorar a qualidade biológica da água desde a bacia de manancial, garantimos também a proteção dos ecossistemas aquáticos, que são essenciais para a manutenção do ciclo hidrológico e para a biodiversidade.
- Auxiliar na superação de desafios operacionais: Eventos como entupimento de filtros e sistemas de tratamento das Estações de Tratamento de Água (ETAs) podem comprometer a eficácia do próprio tratamento. A presença inesperada de macro e microrganismos no sistema, seja por falhas operacionais ou por sobrecarga, pode resultar em sua passagem pelo tratamento, chegando até as residências e empresas que utilizam a água tratada.
- Proteger a operação: Em caso de falhas ou eventos inesperados que possam causar indisponibilidade hídrica - seja por qualidade ou quantidade - é

fundamental que haja planos de contingência bem estabelecidos e eficazes para garantir a continuidade do fornecimento de água. Esses planos passam pelo conhecimento dos processos biológicos que ocorrem nos mananciais de abastecimento.

- Garantir uma relação de transparência entre a empresa prestadora de serviços de saneamento e sociedade: Além de focar na gestão e monitoramento dos mananciais, este projeto também possibilita avançar em um ponto bastante relevante e sensível, a comunicação transparente e efetiva de seus resultados e descobertas à sociedade. Isso permite uma compreensão mais profunda dos esforços em andamento e reforça a confiança no sistema de abastecimento.

O projeto Yva'é - Desenvolvimento de ferramentas metodológicas para monitoramento biológico de mananciais de abastecimento tem como objetivo desenvolver, adaptar, validar e implementar metodologia baseada em eDNA/Metagenômica, para a caracterização, monitoramento de populações de invertebrados, zooplânctônicos e cianobactérias em água in natura, nas bacias de mananciais e reservatórios da SANEPAR.

O projeto, sintetizado na Figura 1 e criado de modo a atender a todos os quesitos do Chamamento Público Nº 001/2023 GHID, visa não apenas proteger os recursos hídricos atuais, mas também, através do desenvolvimento, aperfeiçoamento e aplicação de ferramentas moleculares de última geração, garantir seu uso sustentável para as gerações presentes e futuras. Assim, não há nenhum exagero em se afirmar que assegurar um futuro em que o acesso à água potável de qualidade seja uma realidade para todos os paranaenses passa também pela abordagem proativa dos riscos e desafios biológicos associados ao abastecimento de água.

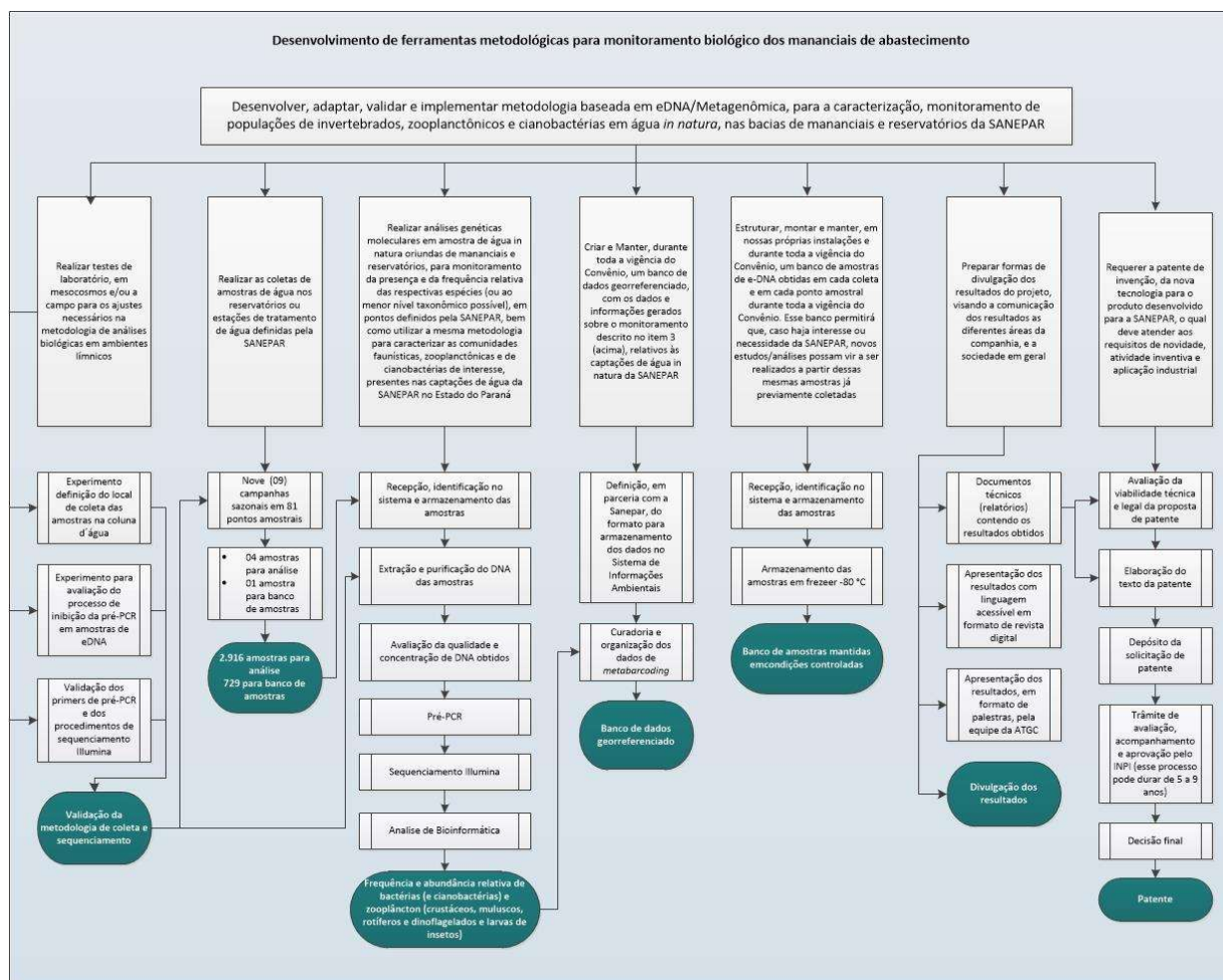


Figura 1. Fluxograma detalhando o objetivo geral, os objetivos específicos, as etapas de execução e os produtos que serão gerados (destacados em verde). O objetivo geral e os objetivos específicos são referentes aos descritos no edital nº 001/2023 GHID.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Desenvolver, adaptar, validar e implementar metodologia baseada em eDNA/Metagenômica, para a caracterização, monitoramento de populações de invertebrados, zooplânctônicos e cianobactérias em água in natura, nas bacias de mananciais e reservatórios da SANEPAR.

1.2.2 Específicos

- a) Realizar testes de laboratórios, em mesocosmos e/ou a campo para os ajustes necessários na metodologia de análises biológicas em ambientes límnicos;
- b) Realizar as coletas de amostras de água nos reservatórios ou estações de tratamento de água definidas pela SANEPAR;
- c) Realizar análises genéticas moleculares em amostra de água in natura oriundas de mananciais e reservatórios, para monitoramento da presença e da frequência relativa das respectivas espécies (ou ao menor nível taxonômico possível), em pontos definidos pela SANEPAR, bem como utilizar a mesma metodologia para caracterizar as comunidades faunísticas, zooplânctônicas e de cianobactérias de interesse, presentes nas captações de água da SANEPAR no Estado do Paraná;
- d) Criar e Manter, durante toda a vigência do Convênio, um banco de dados georreferenciado, com os dados e informações gerados sobre o monitoramento descrito no item 3 (acima), relativos às captações de água in natura da SANEPAR;
- e) Estruturar, montar e manter, em suas próprias instalações e durante toda a vigência do Convênio, um banco de amostras de eDNA obtidas em cada coleta e em cada ponto amostral durante toda a vigência do Convênio. Esse banco permitirá que, caso haja interesse ou necessidade da SANEPAR, novos estudos/análises possam vir a ser realizados a partir dessas mesmas amostras já previamente coletadas;
- f) Preparar formas de divulgação dos resultados do projeto, visando a comunicação dos resultados as diferentes áreas da companhia, e a sociedade em geral;

- g) Requerer a patente de invenção, da nova tecnologia para o produto desenvolvido para a SANEPAR, o qual deve atender aos requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial.

1.3 Metas e etapas de execução

No Edital N° 001/2023 GHID são apresentados, no Anexo II – Projeto Básico, o objetivo geral, os objetivos específicos, as metas e as etapas de execução que devem ser atendidas pelo plano de trabalho. Com o objetivo de facilitar a visualização de cada item, bem como as suas inter-relações, elaboramos o fluxograma apresentado na Figura 2. Nesta figura, o texto do objetivo geral é apresentado na íntegra (vide página 44 do Edital N° 001/2023 GHID). Já o texto dos objetivos específicos, metas e etapas de execução foram sintetizadas para que fossem compatíveis com a formatação do fluxograma. Apesar de resumidos, o conteúdo é compatível com as descrições detalhadas apresentadas nos itens 1.3.2 (Objetivos Específicos – páginas 44 e 45), 2. (Metas – páginas 45 e 46) e 3. (Etapas de Execução – páginas 46, 47 e 48) do Edital N° 001/2023 GHID.

Todos os procedimentos técnicos e analíticos descritos no presente plano de trabalho foram delineados com o objetivo de atender todos os itens descritos no Edital N° 001/2023 GHID.

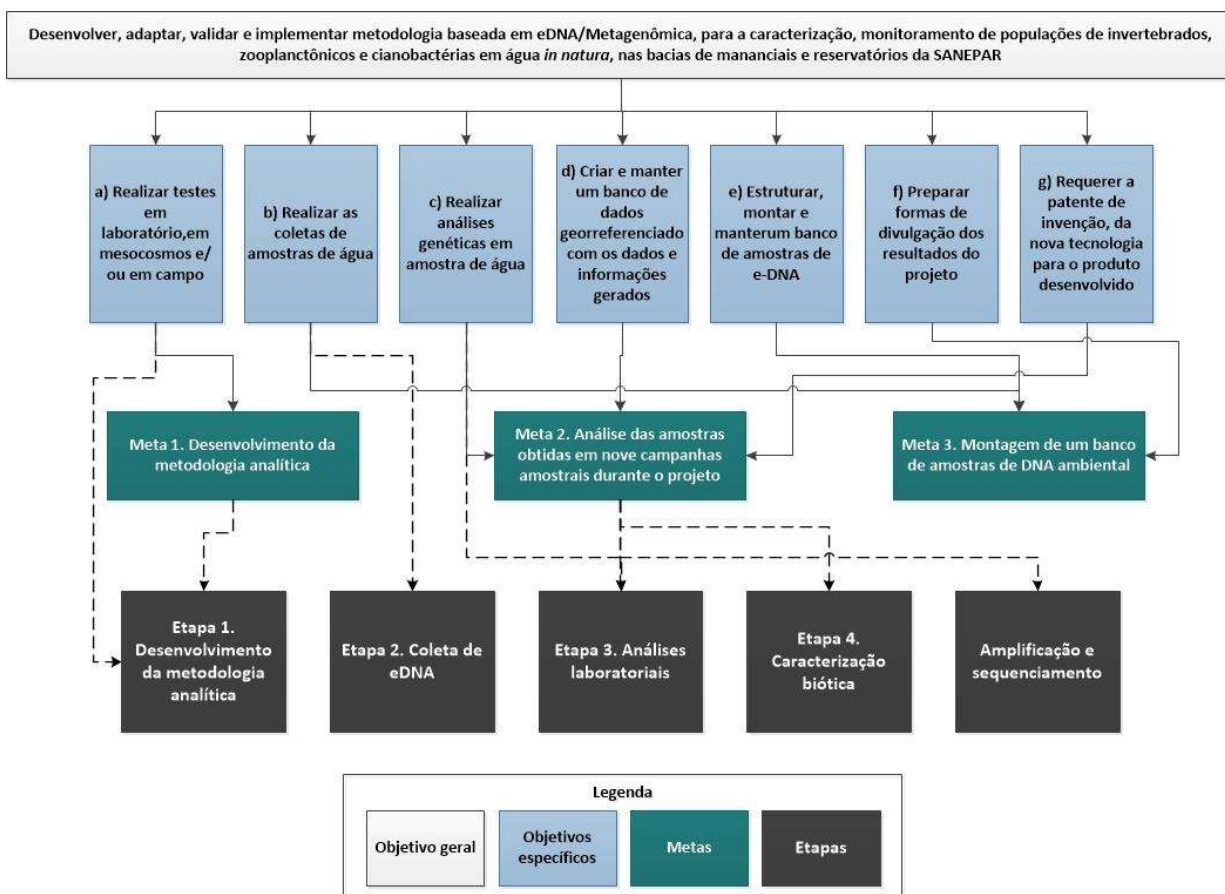


Figura 2. Fluxograma descrevendo o objetivo geral, os objetivos específicos, as metas e as etapas de execução que devem ser atendidas pelo plano de trabalho (PT), de acordo com o edital 001/2023 GHID.

1.4 Material e métodos

1.4.1 Testes para ajustes da metodologia

Os experimentos descritos abaixo foram delineados com base em resultados do processo de coleta e análises de amostras para sequenciamento genético de nova geração (análise da presença de invertebrados, zooplâncton e peixes) já realizadas pela ATGC Genética Ambiental LTDA no Reservatório do Passaúna (Serviço prestado para a Sanepar – julho/agosto de 2023) e no reservatório da UHE de São Salvador (Projeto de Pesquisa e Desenvolvimento financiado pela Engie Brasil – dez2020 a nov2024). O objetivo desses testes é ajustar a metodologia para aumentar a precisão dos procedimentos de coleta e de análise de amostras de eDNA nos diferentes pontos amostrais definidos pela Sanepar no Edital N° 001/2023 GHID e subsidiar as diversas

políticas de gestão hídrica da Sanepar para implementação de seu Plano de Segurança Hídrica.

1.4.1.1 Teste e validação dos *primers*

O *primer* desempenha um papel crucial no sequenciamento genético de nova geração (NGS) aplicado ao *metabarcoding*. O *metabarcoding* é uma técnica que envolve a amplificação e sequenciamento de uma região específica do DNA para identificar e quantificar a diversidade de organismos presentes em uma amostra ambiental ou biológica. Para isso, os *primers* são projetados ou desenhados para se ligarem de maneira específica à região de interesse do DNA. Isso garante que apenas o DNA-alvo seja amplificado e sequenciado, evitando a amplificação de DNA não relacionado que poderia gerar resultados falsos ou não relevantes.

Todavia, antes da utilização de um conjunto de *primer* é necessário a realização de testes de validação. A validação de *primers* usando curva de *melting* é uma técnica comumente usada para avaliar a especificidade e eficiência dos *primers* utilizados em reações de amplificação de DNA, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou a PCR em tempo real (qPCR). A curva de *melting* é gerada por meio da análise da fluorescência do DNA durante o aquecimento gradual da amostra. Os *primers* são projetados para se ligarem a sequências específicas de DNA, e a curva de *melting* permite determinar a temperatura na qual os produtos de amplificação começam a se dissociar em fitas simples de DNA.

Para realizar a curva de *melting* a reação de qPCR deve ser preparada com os *primers* que serão testados, a DNA polimerase, os nucleotídeos e o DNA alvo. Também deve ser realizada a inclusão de controles adequados, como um controle positivo (DNA alvo conhecido) e um controle negativo (sem DNA alvo). Utilizando as informações de temperatura de desnaturação, anelamento e extensão de cada *primer*, um programa de ciclagem deve ser criado. Após a amplificação, o programa vai iniciar a realização da curva de *melting*, que consiste no aumento gradual da temperatura. Durante esse processo, a fluorescência da amostra é monitorada em tempo real. Durante a realização do ensaio da curva de *melting* será realizada a determinação da temperatura de fusão

(T_m) dos produtos de amplificação. A T_m é a temperatura na qual metade dos produtos de amplificação estão desnaturados e metade permanece em dupla fita.

Analisando a curva de *melting* é possível verificar a presença dos picos onde ocorreu a temperatura de fusão. Com a utilização de diferentes controles na mesma amostra, é possível avaliar a capacidade do *primer* amplificar especificamente sequências do DNA alvo. Dessa forma, a validação dos *primers* usando a curva de *melting* é uma etapa importante para garantir a qualidade dos resultados da PCR e a especificidade para identificação do DNA alvo.

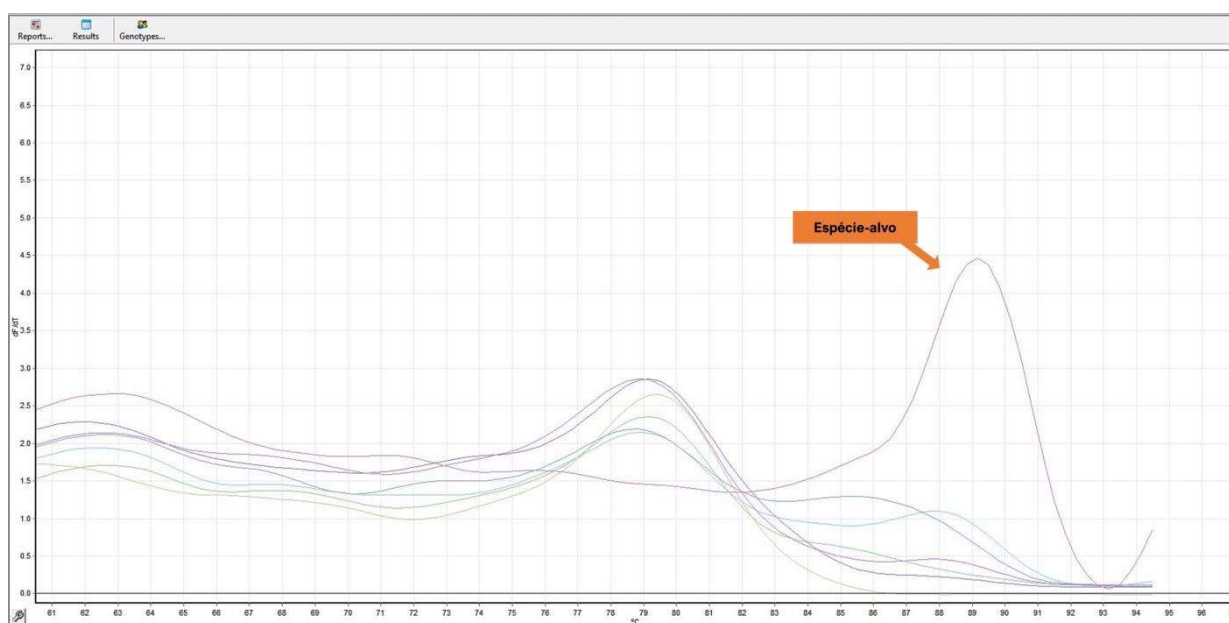


Figura 3. Exemplo da curva de *melting* de um conjunto de *primer* para análise de amostras de eDNA por PCR. Na imagem é possível visualizar o pico de amplificação do gene de interesse somente para a espécie-alvo, o que indica a eficiência e especificidade do *primer*.

Além da análise de especificidade, também é importante a realização de um teste de sensibilidade do *primer* em relação a sua capacidade de quantificar a presença do DNA alvo. Para isso, uma qPCR é realizada utilizando, como amostra, um gradiente de concentração do DNA da espécie alvo. Dessa forma, é possível identificar qual o gradiente de concentração o *primer* consegue detectar durante a realização do ensaio.

Após a validação e estabelecimento da sensibilidade, os conjuntos de *primers* que apresentarem maior eficiência serão selecionados para utilização nas análises de sequenciamento genético.

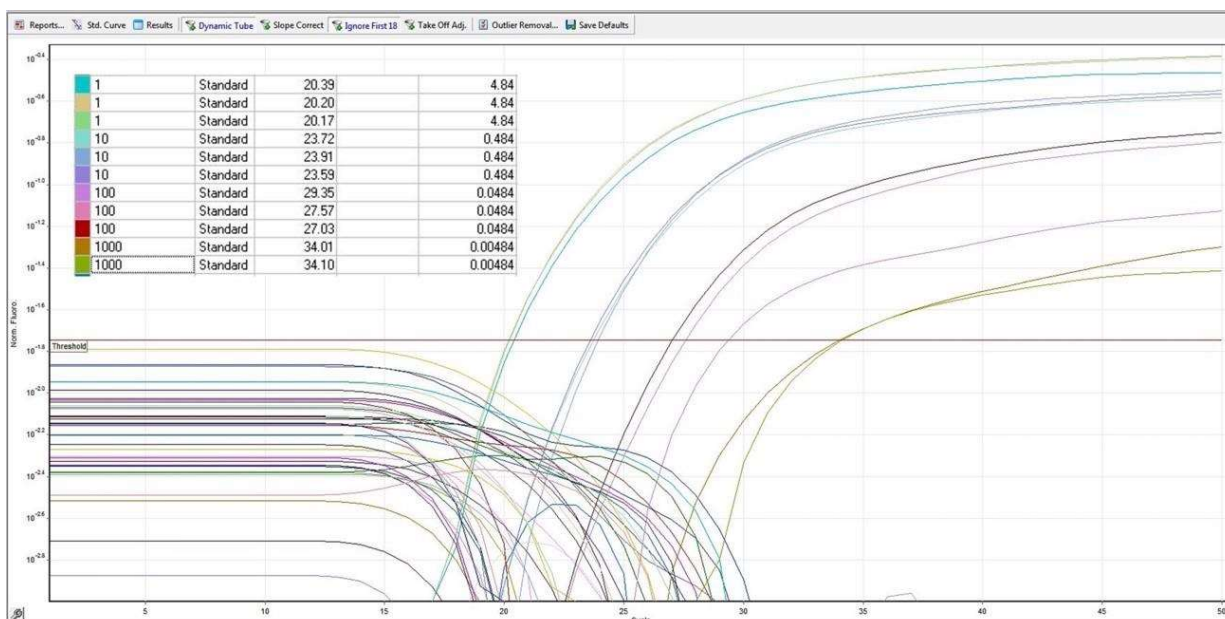


Figura 4. Exemplo de um teste de sensibilidade de um conjunto de *primer* para análise de amostras de eDNA. As diferentes curvas do gráfico representam os diferentes pontos da curva de diluição de uma amostra de concentração de DNA conhecida. Esses resultados serão utilizados como indicador da menor concentração de DNA-alvo na amostra necessário para que ocorra amplificação durante a análise por PCR.

1.4.1.1.1 Teste de especificidade (curva de *melting*) e sensibilidade

No presente teste será avaliada a especificidade (curva de *melting*) para os diferentes conjuntos de *primers* desenhados para a identificação das espécies-alvo (invertebrados zooplancônicos e cianobactérias) descritos no edital número 001/2023 GHID. Para esses grupos, espera-se que seja necessário o desenho de, pelo menos, dois pares de *primers* (16S para bactérias e 18S ou COI para invertebrados). Ao escolher os *primers* corretos, é possível direcionar grupos taxonômicos específicos de organismos. Isso é importante quando se deseja investigar uma comunidade específica, como um grupo de bactérias, fungos ou animais. Os *primers* podem ser selecionados para amplificar sequências de DNA que são altamente conservadas dentro do grupo desejado, facilitando a identificação.

Para a realização do teste, serão utilizadas amostras de controle positivo (homogenato de tecido de espécies-alvo contendo DNA), controles negativos (homogenato de tecido de outras espécies/grupos que ocorram na região do estudo) e branco (sem adição de DNA). Para o conjunto de *primer* que apresentar melhor

desempenho no teste de especificidade, será realizado um teste de sensibilidade. Para isso, serão utilizadas sondas de hidrólise (TaqMan) com o auxílio de um RotorGene® Q (Qiagen, Alemanha). As amostras de tecido das espécies-alvo serão obtidas por meio de processo de digestão (200 µL de buffer de digestão e 20 µL da proteinase K, seguido de 12 h de incubação a temperatura de 56 °C). Após esses procedimentos, o extrato será submetido a amplificação do gene de interesse e quantificado utilizando o kit dsDNA BR, no Qubit® 4.0. A qPCR consistirá na adição do extrato de DNA em uma mistura de reagentes (Master Mix - 0,75 µL do *primer* e 0,25 µL da sonda de hidrólise, ambos em uma concentração final de 10 µM). Para finalizar, serão distribuídos 6 µL do mix em cada poço da placa, pipetado 3 µL do extrato de DNA.

Para a realização do teste de sensibilidade, uma qPCR será realizada utilizando um gradiente de diluição (11 diluições – de 4,8 a 0,000000000048 ng/µL) da amostra de tecido da espécie-alvo, além do teste com outras espécies (mesmas utilizadas na curva de *melting*) e branco.

1.4.1.2 Controle da inibição da PCR em amostras ambientais

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica amplamente utilizada para amplificar regiões específicas do DNA e RNA, permitindo a amplificação, detecção e caracterização do material genético. No caso do sequenciamento genético de nova geração, a PCR se caracteriza como uma etapa essencial para a obtenção de um maior número de sequências do gene-alvo que será estudado. No entanto, em amostras ambientais, como solo, água, sedimentos e amostras biológicas complexas, pode ocorrer a presença de compostos ou substâncias que interferem na PCR, resultando na inibição ou na diminuição da eficiência da reação. A inibição da PCR em amostras ambientais é um desafio comum em laboratórios de biologia molecular.

A inibição da PCR em amostras ambientais pode ser causada por diversos fatores, incluindo i) contaminantes (substâncias químicas presentes na amostra, como polifenóis, húmus, taninos, metais pesados ou produtos químicos residuais de processos de extração), ii) inibidores naturais (alguns componentes das amostras, como compostos de lipídios, polissacarídeos e proteínas, podem se ligar às enzimas ou às moléculas de DNA/RNA, impedindo a amplificação), iii) resíduos de extração

(métodos de extração de DNA/RNA podem resultar em resíduos de solventes, sais ou outros componentes que interferem na PCR) e/ou iv) presença de inibidores microbianos (em amostras biológicas, a presença de micro-organismos vivos ou fragmentos celulares pode conter substâncias que inibem a PCR).

Do ponto de vista analítico, várias estratégias podem ser adotadas para superar a inibição da PCR em amostras ambientais. Todavia, essas estratégias são dependentes do tipo de “contaminação” ou inibidor presente em cada amostra. Por esse motivo, testes prévios devem ser realizados com o objetivo de identificar a metodologia analítica mais adequada para viabilizar a amplificação do DNA-alvo em cada conjunto de amostras. Considerando que as amostras referentes a presente proposta serão coletadas em 81 pontos, pertencentes a ambientes aquáticos de diferentes características hidrológicas e ambientais e que abrangem todas as bacias hidrográficas do estado do Paraná, a realização de testes de caracterização da ocorrência de inibição e do tipo do inibidor é essencial para o estabelecimento de uma estratégia analítica que seja capaz de superar a inibição da PCR nesse grande cenário amostral.

1.4.1.2.1 Avaliação da “contaminação” de amostras de eDNA por substâncias inibidoras da PCR

Os testes serão realizados em amostras dos diferentes pontos de coleta definidos pela Sanepar. Após a coleta, filtragem, fixação, extração e purificação das amostras, o sucesso da amplificação do gene de interesse (gene mitocondrial COI) utilizando um conjunto de *primer* específico, os extratos serão submetidos a um cuidadoso procedimento para quantificação e avaliação da sua pureza do DNA obtido. Primeiramente, será realizada análise por espectrofotometria (NanoDrop®). A quantificação da absorbância a 260 nm é amplamente utilizada para estimar rapidamente as concentrações de ácidos nucleicos antes da utilização de extratos contendo DNA para análises moleculares. Além da concentração, as razões de pureza 260/280 e 260/230 nm são utilizadas como indicadores do sucesso da extração do DNA, principalmente por acusar contaminações com proteínas e compostos fenólicos. Essas razões precisam ser interpretadas juntamente com os valores de concentração de DNA obtidos, pois podem determinar quão representativa é a leitura obtida a 260

nm em relação ao DNA presente naquela amostra e, portanto, em relação ao valor calculado para a concentração de DNA. Uma alta absorbância a 260 nm pode, na realidade, ser o reflexo de uma alta contaminação da amostra por proteínas, por exemplo. Em geral, valores de 1,8 a 2,0 e 1,8 a 2,2 são esperados para as relações 260/280 e 260/230, respectivamente.

Além da análise de quantificação de DNA total por espectrofotometria (NanoDrop®), também será realizada a análise por fluorometria (Qubit®). Em geral, a metodologia Qubit® apresenta maior precisão quanto a concentração real de DNA viável na amostra por utilizar um marcador que se liga a molécula de dupla fita de DNA, ou seja, se liga a moléculas integras que serão aquelas moléculas que, efetivamente, serão lidas nas etapas de amplificação e sequenciamento.

1.4.1.2.2 Estabelecimento de estratégias analíticas de controle da inibição

A presença de substâncias de diferentes origens no ambiente aquático pode afetar o processo de amplificação do gene de interesse durante as análises de metagenômica. Quantidades extremamente pequenas de substâncias húmicas (tão pequenas quanto 1 ng) em amostras ambientais, por exemplo, apresentam a capacidade de inibir a PCR (Menking, Emanuel et al. 1999). De fato, um grande desafio para a detecção de DNA-alvo em amostras ambientais é que, invariavelmente, irá conter substâncias que são co-purificadas com DNA molde e inibem a amplificação. Vários métodos têm sido estudados para reverter os efeitos inibitórios dessas substâncias, particularmente no solo (Straub, Pepper et al. 1995, Yeates, Gillings et al. 1998, Van Dyke and McCarthy 2002, Braid, Daniels et al. 2003) e em amostras de água (Gantzer, Senouci et al. 1997, Reynolds, Gerba et al. 1997, Boeger, Pie et al. 2007). Inclusive, no trabalho desenvolvido pelo nosso grupo (Boeger, Pie et al. 2007) foi realizada uma comparação de diferentes métodos para solucionar o problema da inibição da PCR. Nesse artigo, em que foi testado o efeito da adição de albumina de soro bovino (BSA), dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol na reação da PCR, os resultados indicaram que a adição de 0,5 µg/µL de BSA foi a prática metodológica mais eficiente para reverter a inibição da PCR em amostras ambientais.

Em laboratório, uma série de testes/experimentos podem ser executados com o objetivo de contornar casos de inibição. Abaixo, são apresentadas estratégias analíticas que poderão serão adotadas:

1. **Diluição da amostra:** Diluir a amostra para reduzir a concentração de inibidores.
2. **Purificação do DNA/RNA:** Utilizar kits de purificação de DNA/RNA para remover contaminantes e inibidores da amostra.
3. **Adição de agentes desnaturantes:** Adicionar substâncias adjuvantes como o dimetilsulfóxido (DMSO), betaína, glicerina e/ou albumina (BSA) à reação de PCR para desestabilizar inibidores.
4. **Otimização das condições de PCR:** Alterar os parâmetros da PCR, como temperatura de anelamento, concentração de primers, ciclo de extensão etc., para reduzir a interferência.
5. **Controles Internos:** Incluir controles internos na reação de PCR para monitorar a presença de inibidores e validar os resultados.
6. **Extração de DNA/RNA alternativa:** Experimentar diferentes métodos de extração de DNA/RNA para minimizar a co-extração de inibidores.

Ao longo do processo de estabelecimento dos métodos analíticos mais adequados para contorno da inibição, serão realizados testes de PCR para avaliar a presença/amplificação da sequência-alvo após a aplicação do método de controle de inibição testado. Para alguns casos, como já vivenciado em nossa rotina laboratorial, é necessária a combinação de diferentes estratégias para o controle da inibição.

1.4.1.3 Deslocamento do DNA na coluna d'água

A preferência quanto a posição na coluna d'água por organismos aquáticos varia amplamente dependendo do tipo de organismo, suas necessidades biológicas e comportamentais, e o ecossistema em que habitam. Diferentes espécies têm adaptações específicas para diferentes níveis de profundidade na coluna d'água, e essas preferências podem ser influenciadas por fatores como luz, temperatura, disponibilidade de alimento, oxigênio dissolvido e abrigo. O fitoplâncton (composto por organismos microscópicos que realizam fotossíntese), por exemplo, tende a habitar as camadas superficiais da coluna d'água, onde a luz é abundante para a fotossíntese. Já

o zooplâncton (grupo diversificado de organismos aquáticos composto por pequenos animais que flutuam na coluna d'água e desempenham um papel crucial nas cadeias alimentares aquáticas, servindo como alimento para uma variedade de outros organismos), pode ocorrer em várias profundidades da coluna d'água, migrando verticalmente em busca de alimento e evitando predadores. Consequentemente, pode ocorrer uma maior disponibilidade de DNA de determinada espécie na coluna d'água de acordo com os hábitos e preferências de cada espécie/grupo zoológico. Essa informação é de grande relevância quando é considerado o local onde devem ser coletadas as amostras de eDNA no ambiente aquático. Dessa forma, o objetivo dos experimentos descritos abaixo é avaliar o processo de dispersão do DNA na coluna d'água para o estabelecimento da melhor profundidade de coleta (altura da coluna d'água) para amostras de DNA ambiental.

1.4.1.3.1 Descrição da unidade experimental

Ensaio será realizado em um aparato que será construído especialmente para simular a coluna d'água em um ecossistema limnológico lântico. O aparato consiste em um tubo de cloreto de polivinila (PVC), com 20 cm de diâmetro e 5 metros de profundidade, com capacidade para 160 litros de água, mantido em posição vertical (Figura 5). Nas posições correspondentes a 0, 1, 2, 3, 4 e 5 metros de profundidade, o aparato será equipado com septos cromatográficos que permitem a inoculação de amostras de eDNA e a amostragem da água, utilizando seringa e agulha, sem gerar nenhuma turbulência na água. Também serão instaladas torneiras que permitem o esgotamento do aparato, procedimento necessário para limpeza e desinfecção prévios à execução dos experimentos.



Figura 5. Ilustração do sistema experimental. Será utilizado um tubo de PVC de 20 centímetros de diâmetro e 5,5 metros de comprimento. Para a injeção e coleta de amostras de eDNA serão instalados septos cromatográficos com o objetivo de simular diferentes alturas da coluna d'água (0, 0.3, 0.6, 1, 2, 3, 4 e 5 m). Duas caixas d'água de 100 litros serão utilizadas como reservatório de água.

1.4.1.3.2 Preparação da unidade experimental

A preparação da unidade para início de cada um dos experimentos seguirá três etapas: descontaminação, enxágue e preenchimento. A etapa de descontaminação se iniciará com uma breve lavagem do aparato com água corrente, seguida pelo preenchimento completo da estrutura com uma solução de hipoclorito de sódio 1%. A solução será mantida na estrutura por um período de 24 horas, com o objetivo de promover a degradação de quaisquer vestígios de DNA das espécies-alvo que possam

estar presentes. Após 24 horas, a solução de hipoclorito será retirada e serão realizadas lavagens sucessivas da estrutura (mínimo de quatro lavagens) utilizando-se água livre de DNA.

O processo de obtenção da água livre de DNA envolve a descontaminação da água de torneira pela adição de hipoclorito de sódio 12% (0,17 mL/L), seguida pela neutralização do cloro com solução de tiosulfato 50% (0,1 mL/L). Ao final do processo de lavagem, a ausência de cloro no sistema será confirmada através de um teste colorimétrico. Caso o teste demonstre presença de cloro, os processos de enxágue do aparato deverão ser repetidos. Ao final do processo de desinfecção e lavagem, o aparato deverá ser preenchido com água livre de DNA e permanecer em repouso por 24 horas até o início do experimento.

1.4.1.3.3 Obtenção de amostras de eDNA

Para avaliar a dispersão do eDNA pela coluna d'água será necessária a obtenção de alíquotas de DNA concentrado de espécies-alvo que serão injetadas no aparato experimental durante o experimento, simulando assim liberações que acontecem naturalmente no ambiente. Para simular a dispersão de diferentes tipos de partículas de DNA, serão utilizados dois tipos de alíquotas: uma obtida através de amplificação por PCR para simular uma cadeia de DNA curta e livre, e outra obtida diretamente dos organismos-alvos, representando as variadas condições em que o DNA se encontra no ambiente (DNA livre, DNA intracelular, DNA adsorvido a outras partículas, etc.). Como alvos, foram selecionadas as espécies *Limnoperna fortunei* (mexilhão-dourado) e *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo), que vêm sendo utilizadas como espécies modelo em estudos envolvendo DNA Ambiental.

Para a obtenção de produto de PCR, as alíquotas de DNA serão obtidas através da amplificação de fragmentos do DNA das espécies-alvo através de PCR. Para cada espécie, será amplificado um fragmento do gene COI através de conjuntos de *primers* específicos. Para o mexilhão-dourado, será amplificado um fragmento de 100 pb, obtido através dos *primers* F (5' GGGACTGGTTGGACAGTTTAT 3') e R (5' ACGCACCAGCTAAATGAAGA 3'). Para a tilápia-do-nilo, será amplificado um fragmento de 166 pb, obtido através dos *primers* F (5'

ACATGAAACCCCCTGCCATCTC 3') e R (5' CCTCCGGCAGGGTCAAAGAAG 3'). Os ensaios de PCR serão realizados em uma reação de volume final de 25 μ L, contendo 25 μ M de cada primer, 0,32 mM dNTP mix, 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase, 1 X tampão de Platinum Taq e 5 mM $MgCl_2$. A condição de termociclagem a ser testada envolverá a desnaturação inicial de 1 min a 95 °C, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 10 segundos, anelamento de 60° C por 10 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos. Os produtos das PCR deverão ser quantificados utilizando o fluorômetro Qubit 4. Os ensaios de PCR serão repetidos para cada espécie-alvo, até que se obtenham alíquotas de DNA de 1 mL com aproximadamente 2.000 ng de DNA alvo. As alíquotas deverão ser armazenadas a -80 °C até que se iniciem os experimentos.

O procedimento de obtenção de alíquotas de eDNA será realizado em várias etapas. Em um béquer com capacidade de 2 L, será adicionado 1 L de água livre de DNA, e serão transferidos indivíduos vivos da espécie-alvo em densidade de 10 g/L. Os organismos serão mantidos por um período de 24 horas, com aeração constante e em temperatura ambiente. Após este período, os animais serão retirados e a água separada em alíquotas. Cada espécie será testada separadamente. Separadamente, uma amostra de 10 g de tecido de indivíduos das espécies-alvo será macerada com auxílio de um almofariz. Após este processo, o tecido macerado será transferido para um tubo tipo Falcon (50 mL) para homogeneização em vórtex com 40 mL de água ultrapura. O tubo com a mistura será centrifugado (2 min, 6.000 RPM) para separação da fração sólida mais grosseira. O sobrenadante será separado e armazenado a -80 °C. Paralelamente, amostras de 0,05 g de tecido das espécies-alvo serão submetidas a um processo de digestão para a liberação do material genético intracelular. Para isso, será adicionado de 20 μ L de proteinase K e 200 μ L de tampão de digestão (SDS 1%, Tris 30 mM e EDTA 10 mM), seguido de incubação a 56 °C por 24 horas. Após a incubação, o conteúdo do tubo será homogeneizado e centrifugado (2 min, 13.000 RPM) para obtenção do sobrenadante, que será armazenado a -80 °C, até que seja utilizada na composição da alíquota de eDNA. A alíquota de eDNA de cada uma das espécies alvo será composta de 520 μ L da água de manutenção dos animais, 390 μ L do sobrenadante de tecido macerado e 390 μ L do sobrenadante de tecido digerido. As

alíquotas de 1,3 mL poderão ser imediatamente utilizadas nos experimentos ou armazenadas a -80 °C para posterior utilização. Antes da utilização da alíquota no experimento, será realizada a determinação da concentração total do DNA da espécie alvo por PCR em tempo real (qPCR).

1.4.1.3.4 Design experimental

Cumpridos os passos pré-estabelecidos, e estando prontas as amostras de eDNA, o experimento será iniciado, estando o aparato experimental preenchido com água livre DNA e devendo passar por um período de 24 horas para que não haja qualquer turbulência no interior do aparato.

Serão realizados quatro ensaios experimentais baseados nas diferentes amostras de eDNA e diferentes espécies-alvo, sendo: 1° - DNA produto de PCR de mexilhão-dourado; 2° - eDNA obtido diretamente de mexilhão-dourado; 3° - DNA produto de PCR de tilápia-do-Nilo; e 4° - eDNA obtido diretamente de tilápia-do-Nilo.

Para obtenção da amostra-controle, em cada ensaio experimental será retirada, com auxílio de seringa com agulha, uma única amostra, de 3 mL, de cada profundidade (0, 1, 2, 3, 4 e 5 m). A coleta será realizada imediatamente antes da inoculação da alíquota de DNA no aparato. Após a coleta, as amostras serão acondicionadas em tubos tipo Eppendorf (2,0 mL) e armazenadas a -80 °C até o momento de processamento.

As alíquotas de DNA (produto de PCR ou eDNA) serão inoculadas no aparato experimental na maior profundidade (5 m). A alíquota será inoculada com auxílio de uma seringa com agulha. Para alíquotas de DNA obtidas através de produto de PCR, será inoculado volume total de 1 mL e para alíquotas de eDNA obtidas diretamente dos organismo-alvo (eDNA) será inoculado volume de 3 mL.

Nos tempos 0, 30 min, 1, 2, 4, 8, 16 e 24 h que sucedem à inoculação da alíquota de eDNA no aparato, serão coletadas amostras de 3 mL de água em cada uma das profundidades de amostragem (0, 1, 2, 3, 4 e 5 m). As amostras deverão ser acondicionadas em tubos tipo Eppendorf (2,0 mL) e armazenadas a -80 °C até o momento de processamento.

1.4.1.3.5 Processamento e análise das amostras

As amostras deverão ser descongeladas em temperatura ambiente para que sejam processadas. As amostras cujos ensaios forem feitos com eDNA obtido diretamente do organismo deverão passar por um processo de digestão antes do processo de extração, composto por 1 mL de cada amostra, 200 µL de Tampão de Digestão (SDS 1%, Tris 30 mM e EDTA 10 mM) e 20 µL de proteinase K, submetidos a incubação a 56 °C por 24 horas. Todas as amostras deverão passar então pelo processo de extração de DNA utilizando o protocolo de Imobilização Reversível em Fase Sólida (SPRI). No processo, 1 mL da amostra é incubado em solução com uma concentração final de 12,5% peso/volume PEG-8000, 0,7 M de NaCl e 0,02 mg/mL de esferas magnéticas carboxiladas, à temperatura ambiente por 10 minutos, para condensação do DNA e adesão às esferas magnéticas. As amostras serão então magnetizadas usando raques magnéticas de neodímio (NEB) e o sobrenadante removido, utilizando uma micropipeta. As amostras serão secas em temperatura ambiente e eluídas em 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA) e misturadas suavemente. Após a separação do DNA das esferas magnéticas, as amostras serão novamente magnetizadas e o sobrenadante com o DNA recolhido e armazenado em novos tubos. Após as extrações, as amostras serão quantificadas através de qPCR com sonda de hidrólise (TaqMan), visando quantificar a concentração inicial dos fragmentos do gene COI de cada espécie alvo.

Os ensaios de qPCR serão executados com um volume final de 10 µL, com as seguintes concentrações: 0,75 µM de cada primer, 0,25 µM de sonda, 0,06 M de betaína, 0,05 µg/µL de BSA, 0,3 µL de glicerina vegetal P.A. e 1 X QuantiNova Probe PCR Kit (Qiagen). Cada amostra será processada em triplicata, com 3 µL de extrato sendo usados em cada reação. As condições de ciclagem serão de 2 min a 95 °C para ativação da enzima, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 5 segundos e anelamento e extensão combinados a 60 °C por 5 segundos.

1.4.1.3.6 Análises estatísticas

Após a obtenção dos dados, serão realizados testes para avaliar a normalidade e homoscedasticidade. Com base nos resultados obtidos, serão utilizados os testes estatísticos adequados para a comparação das médias.

1.4.2 Coletas de amostras de água

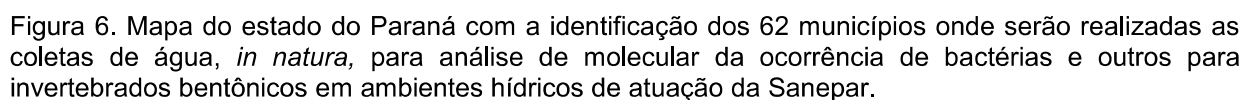
As coletas serão realizadas pela equipe técnica da ATGC Genética Ambiental LTDA em 62 (sessenta e dois) municípios do estado do Paraná (Figura 6), totalizando 81 (oitenta e um) pontos amostrais (Tabela 1). Os locais de coleta foram definidos no item 4.3.1 do Edital N° 001/2023 GHID (páginas 49 a 52). As coordenadas geográficas de cada ponto serão disponibilizadas pela Sanepar, após a assinatura do convênio. As coletas serão realizadas sazonalmente (a cada 3 meses – nas diferentes estações do ano) e, ao todo, serão realizadas 9 campanhas amostrais ao longo do projeto. O projeto terá período total de execução de 36 meses e as coletas/análises laboratoriais serão realizadas dentro de um intervalo de 28 meses.

Tabela 1. Pontos de coletas de amostras para análises populacionais através de ferramentas genéticas ambientais.

n	Grupos/Municípios	Código SIA	Identificação/Manancial
1	Campo Largo	429	16 - Rio Açungui
2	Cerro Azul	431	Ponto07 - Cerro Azul
3	Colombo	343	Ponto09 - Rio Palmital - São Dimas/Colombo
4	Colombo	406	Rio Capivari Captação
5	Almirante Tamandaré	342	Ponto05 - Rio Barigui – Alm. Tamandaré
6	São Jose dos Pinhais	233	Ponto02 - Rio Cotia SJP - Audi
7	Londrina	135	Ribeirão Cafezal
8	Londrina	136	Rio Tibagi
9	Arapongas	11	Ribeirão dos Apertados
10	Rolândia	210	Ribeirão Ema
11	Cornélio Procopio	71	Rio Congonhas
12	Santo Antônio da Platina	223	Ribeirão das Bicas
13	Siqueira Campos	241	Ribeirão Água Fria
14	Maringá	146	Rio Pirapó
15	Umuarama	256	Rio Piava

n	Grupos/Municípios	Código SIA	Identificação/Manancial
16	Campo Mourão	40	Rio do Campo
17	Paranavaí	173	Ribeirão Araras
18	Cianorte	63	Ribeirão Bolívar
19	Jacarezinho	124	Rio Jacarezinho
20	Mandaguari	141	Ribeirão Benjoim
21	Ivaiporã	121	Rio Pindaúva
22	Nova Esperança	158	Ribeirão Paracatú
23	Astorga	18	Ribeirão do Notimbo
24	Ortigueira	435	Rio Barreiros - Ponto 2
25	Jandaia do Sul	125	Rio Marumbi
26	Ponta Grossa	187	Rio Pitangui
27	Ponta Grossa	188	Represa de Alagados
28	Guarapuava	102	Rio das Pedras
29	Castro	57	Rio Iapó
30	Irati	305	Ribeirão Jaú
31	União da Vitória	257	Rio Iguaçu
32	Prudentópolis	192	Rio dos Patos
33	São Mateus do Sul	235	Rio Taquaral
34	Rio Negro	209	Rio Negro
35	Palmeira	168	Rio Pugas
36	Imbituva	109	Rio Ribeira
37	Pinhão	43	Rio Lajeado Grande
38	Ibaiti	106	Ribeirão Grande
39	Pitanga	184	Rio Ernesto
40	Reserva	204	Rio Maromba
41	Piraí do Sul	181	Rio Piraizinho
42	Cambará	31	Córrego Alambari
43	Carambeí	48	Rio São João
44	Tibagi	245	Rio Tibagi
45	Cascavel	53	Rio Cascavel
46	Cascavel	54	Rio Saltinho
47	Cascavel	458	Rio São José - Ponto A
48	Foz do Iguaçu	91	Rio Tamanduá (Ponto 2)
49	Foz do Iguaçu	377	Rio Paraná - Lago de
50	Toledo	248	Rio Toledo
51	Francisco Beltrão	93	Rio Marrecas
52	Pato Branco	174	Rio Pato Branco
53	Telêmaco Borba	244	Rio Tibagi
54	Palmas	167	Rio Caldeira

n	Grupos/Municípios	Código SIA	Identificação/Manancial
55	Medianeira	153	Rio Alegria
56	Dois Vizinhos	82	Rio Girau Alto
57	Quedas do Iguaçu	196	Rio Campo Novo
58	Assis Chateaubriand	17	Rio Alívio
59	Laranjeiras do Sul	132	Rio do Leão
60	Santa Terezinha de Itaipu	220	Rio Paraná (Lago)
61	Ubiratã	255	Rio Água Grande
62	Coronel Vivida	72	Rio Barro Preto
63	Fazenda Rio Grande	384	96 - Rio Faxinal
64	Lapa	404	328- Baixo Várzea
65	Fazenda Rio Grande	482	262-Maurício
66	Fazenda Rio Grande	870	Ponto 04 - Rio Despique
67	Curitiba	760	3 - ETA Passaúna
68	Curitiba	559	208-S - Reserv Passaúna Captação
69	Campo Largo	590	63 - Reservatório Rio Verde
70	Piraquara	561	112 - Rio Piraquara - Saída PI
71	Piraquara	562	300 - S - Res. PII - Tulipa
72	Pinhais	780	116 - Captação ETA Iraí
73	Piraquara	782	106- Rio Piraquara
74	São Jose dos Pinhais	771	117- Rio Pequeno
75	Curitiba	770	120 - Captação ETA Iguaçu (Canal Água Limpa)
76	Quatro Barras	78	502 -Tulipa Reservatório Iraí
77	Região de Londrina	Análise Complementar (dist até 250 Km da sede)	09 campanhas - local a definir durante convênio
78	Região de Maringá	Análise Complementar (dist até 250 Km da sede)	09 campanhas - local a definir durante convênio
79	Região de Cascavel	Análise Complementar (dist até 250 Km da sede)	09 campanhas - local a definir durante convênio
80	Região de Ponta Grossa	Análise Complementar (dist até 250 Km da sede)	09 campanhas - local a definir durante convênio
81	Região de Curitiba	Análise Complementar (dist até 250 Km da sede)	09 campanhas - local a definir durante convênio



1.4.2.1 Coleta, armazenamento e transporte de amostras

38

definida nas etapas iniciais de validação da metodologia do projeto. Durante o processo de coleta o responsável pelo manuseio das amostras usará luvas de procedimento livre de talco, as quais serão obrigatoriamente trocadas entre a coleta em cada um dos pontos amostrais.

Imediatamente após a coleta, as amostras de água serão submetidas a procedimento de filtração em membranas de nitrato de celulose (0,45 µm de poro). O procedimento de filtração será realizado com auxílio de bomba de vácuo e sistema de filtração (Milipore®). Entre a coleta das amostras de cada ponto, todo o material de manipulação (mesa, pinças, sistemas de filtração etc.) das amostras serão desinfetados com solução de hipoclorito de sódio (6%) seguido de enxague com água ultrapura (ddH₂O Evoqua®).

Os filtros contendo o eDNA serão fixados em etanol absoluto (Ensure Merck® - Pureza molecular) e mantidos sob condições de refrigeração (4-8 °C) até serem encaminhados para o laboratório da ATGC em Curitiba, Paraná. No laboratório as amostras serão cadastradas em sistema de gestão de amostras, identificadas (etiquetas individuais resistentes a baixas temperaturas) e armazenadas a -20 °C até a realização das análises moleculares. As amostras destinadas a formação do banco de amostras serão armazenadas em ultra freezer (-80 °C).

1.4.3 Análises moleculares

Quando uma amostra de eDNA é coletada de um corpo hídrico, ela contém resquícios do DNA das diversas espécies que habitam aquele local. No presente projeto, essas amostras serão analisadas por meio de um método de biologia molecular denominado de *metabarcoding*. A técnica consiste na identificação das espécies através da decodificação de informações genéticas relacionadas à identidade taxonômica dos indivíduos que liberam DNA no ambiente. Essas informações são contidas em alguns genes (pequenas porções do DNA do organismo) que tem a importante capacidade de caracterizar a espécie a qual o organismo pertence. A ferramenta usada para transformar a amostra coletada no ambiente em uma lista de

nomes científicos é o sequenciamento genético. No processo de análise de amostras por *metabarcoding* são realizados dois tipos distintos de sequenciamento genético.

O primeiro deles serve para caracterizar as sequências individuais dos genes de interesse para cada espécie que habita o local estudado. Para isso, é necessário realizar a captura do animal no ambiente, identificar morfologicamente a espécie e coletar uma amostra de tecido (que vai conter o DNA). Posteriormente, esse tecido é processado no laboratório e submetido a um sequenciamento denominado de “Sanger”. O resultado do sequenciamento Sanger é uma descrição ordenada de todas as bases nitrogenadas que vão caracterizar a sequência do gene de interesse. De posse das sequências genéticas, do gene de interesse específico, para cada espécie que ocorre em determinado ambiente, é possível a criação de um banco de dados que complementa o conjunto de informações existentes. Aqui, vale ressaltar que sequências geradas por diferentes pesquisadores, para diferentes espécies e genes, podem ser armazenadas em um centro de dados genéticos de acesso mundial chamado de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Dessa forma, para a construção de um banco de dados para um determinado ambiente, como os ambientes aquáticos dulcícolas do presente projeto, é realizado um levantamento das sequências já disponíveis no GenBank. Aquelas que ainda não estão disponíveis precisam ser sequenciadas.

O segundo sequenciamento, por outro lado, será realizado nas amostras de água coletadas no ambiente – que também chamamos de amostras de eDNA. Esse sequenciamento é chamado de nova geração ou *metabarcoding*. Nele, são amplificados todos os fragmentos de DNA (do gene de interesse) que estão contidos na amostra. Posteriormente, utilizando complexos programas computacionais, as sequências obtidas pelo método de *metabarcoding* são comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados – aquele que foi gerado com os dados obtidos com o sequenciamento Sanger ou obtidas no GenBank. A seguir, detalharemos os procedimentos adotados pela ATGC Genética Ambiental para a criação e curadoria do banco de dados de sequências de DNA e para a realização do sequenciamento Sanger e *metabarcoding*.

1.4.3.1 Criação e curadoria de banco de sequências de DNA das espécies-alvo

Imediatamente após a definição dos marcadores moleculares (gene-alvo) que serão utilizados para a identificação das espécies de interesse, será iniciada a montagem e curadoria do banco de sequências genéticas.

Essa etapa inicia-se com a realização de levantamento bibliográfico das espécies/grupos zoológicos de interesse que ocorrem nos ambientes estudados. Com base nessa lista, serão realizadas buscas de sequências do gene-alvo de cada espécie no GenBank. Após esse levantamento, as espécies cujas sequências estão disponíveis no GenBank serão adicionadas ao banco de sequências de DNA do projeto.

Já as espécies cujas sequências não foram obtidas por meio de buscas, deverão ser sequenciadas. Para essa etapa, será necessária a obtenção de amostra de tecido dos organismos de interesse. Para isso, poderão ser realizadas coletas com esse objetivo. Todavia, é importante enfatizar, que durante a realização de outro projeto de monitoramento molecular com a Sanepar, a ATGC Genética Ambiental já realizou a montagem de um banco de dados de sequências genéticas e capturou, identificou e fixou amostras de organismos que poderão ser sequenciados no futuro. Abaixo, apresentamos a metodologia analítica de sequenciamento Sanger que será empregada em amostras de organismos de interesse.

1.4.3.2 Sequenciamento Sanger

O sequenciamento Sanger consiste em uma sequência de procedimentos analíticos com o objetivo de extrair o DNA da amostra de tecido, purificar esse DNA, promover a amplificação do gene de interesse, preparar as amostras e realizar o sequenciamento.

1.4.3.2.1 Extração

A primeira etapa de processamento das amostras de tecido é a extração do DNA. Nela, o material genético presente na amostra é separado do restante da amostra e purificado para que possa seguir para o sequenciamento.

O DNA total das amostras será extraído utilizando um protocolo adaptado de Imobilização Reversível de Fase Sólida. Inicialmente, 0,20 mg de tecido de cada animal será incubado em uma solução de digestão (10 mM TRIS, 30 mM EDTA, 1% SDS e 1 mg/mL proteinase K) a 56 °C por 24 h. Em seguida, os tecidos digeridos serão incubados em uma solução de esferas magnéticas (concentração final de 12,5% polietilenoglicol-8000, 0,7 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0,05% *Tween*-20, 0,02 mg/ml GE *Healthcare SeraMag Speedbeads*) por 10 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a solução será submetida a um campo magnético de neodímio (New England Biolabs RareEarth Magnetic Racks). Após a magnetização das esferas na parede do microtubo, o sobrenadante será removido e descartado. O agrupamento de esferas será ressuspensionado em 1 mL uma solução de esferas magnéticas de mesma concentração e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Após nova magnetização das esferas será realizada a remoção do sobrenadante. O agrupamento de esferas será lavado com uma solução de 2-propanol 70% (500 µL), incubando a temperatura ambiente por 2 minutos e então será removido o sobrenadante. A etapa de lavagem com 2-propanol será repetida duas vezes. Após a segunda lavagem, o conteúdo do tubo será seco (temperatura ambiente). Após a remoção do 2-propanol residual, o agrupamento de esferas será ressuspensionado em tampão TE (10 mM TRIS e 1 mM EDTA) e incubado em 56 °C por 10 minutos. O conteúdo será magnetizado, e o sobrenadante será removido contendo o extrato de DNA puro.

A qualidade dos extratos será avaliada quanto a sua concentração, pureza e fragmentação. A concentração será quantificada utilizando o método de fluorescência do Qubit v4 (ThermoFisher). Será preparada uma solução de trabalho, contendo uma proporção de 1:200 de uma sonda intercalante para o tampão de ligação do kit comercial Qubit dsDNA HS. Um volume de 195 µL da solução de trabalho será distribuído em microtubos de parede fina, e serão adicionados 5 µL dos extratos de DNA. A solução será brevemente homogeneizada e deixada em descanso em temperatura ambiente por 2 min. O conteúdo de DNA será quantificado no Qubit v4 (ThermoFisher) calibrando com os padrões HS1 e HS2.

A pureza dos extratos será avaliada utilizando o método de espectrofotometria do NanoDrop 2000 (ThermoFisher). O equipamento será calibrado utilizando o tampão

TE como branco, e as amostras serão quantificadas em função de avaliar os seus índices 260/280 e 260/230 - que são indicadores de presença de contaminantes comuns de extração. Como a concentração de DNA fornecida pelo equipamento é uma estimativa baseada na absorbância em 260 nm, ela não será utilizada em função da quantificação por Qubit, que retorna uma concentração exata em função da presença de ligação fosfodiéster do DNA fita dupla. Para esta quantificação, serão utilizados 2 µL de extrato em função de gerar uma alta superfície de contato no sensor do equipamento e melhorar a acurácia.

A fragmentação dos extratos será avaliada pelo método de eletroforese. As amostras serão submetidas a separação por eletricidade em um gel de agarose (KASVI) 1% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermofisher) e sua fragmentação será comparada com um padrão de peso molecular de 10 mil pares de bases (New England Biolabs). A avaliação da qualidade será feita observando o padrão de banda dos cromossomos e o arrasto de baixo peso molecular. A leitura do gel será realizada no equipamento E-Gel Imager (Thermofisher).

1.4.3.2.2 PCR

Um fragmento do gene de interesse (definição do gene e conjunto de primers serão definidos após o início do projeto) será amplificado utilizando técnica de PCR. O ensaio será realizado conforme características específicas definidas para cada conjunto de primer. O sucesso da PCR será verificado em eletroforese com gel de agarose (KASVI) 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermofisher). O padrão de bandas será comparado com peso molecular de mil pares de bases (NEB). A leitura do gel foi feita no equipamento E-Gel Imager (Thermofisher) de luz UV.

1.4.3.2.3 Purificação

Após a verificação do sucesso dos ensaios, os produtos de PCR serão purificados utilizando protocolo de SPRI. Será adicionada a solução de esferas magnéticas para um ensaio de concentração final de 18% polietilenoglicol-8000, 1 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0,05% Tween-20 e 0,02 mg/ml GE Healthcare SeraMag Speedbeads. A solução será incubada em temperatura ambiente por 10

minutos e, em seguida, submetida a um ímã de neodímio (New England Biolabs RareEarth Magnetic Racks). Após a magnetização das esferas, o sobrenadante será removido. O agrupamento de esferas será lavado com solução 2-propanol 70% por 2 min, seguido da remoção do sobrenadante. Após a segunda lavagem, o agrupamento de esferas será ressuspendido em tampão TE e incubado em 56 °C por 10 min. A solução será, novamente, submetida a um campo magnético de neodímio, e o sobrenadante contendo o purificado do produto de PCR será removido e armazenado. Os produtos de PCR serão quantificados no Qubit, utilizando o kit Qubit dsDNA HS.

1.4.3.2.4 Reação de Sanger

Será realizado o ensaio de Sanger para preparação dos fragmentos para sequenciamento. A reação ocorrerá em um volume final de 10 µl, com as concentrações finais: 0,35 µM do respectivo primer F ou R, 1 X BigDye Cycle Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Thermofisher®) e 1 X do tampão de reação do BigDye (fornecido com o reagente). O DNA alvo será equimolarizado para 40 ng de DNA total para suas respectivas reações. As condições de ciclagem (tempo e temperatura) serão definidas de acordo com as características dos *primers* utilizados. Os ensaios serão realizados no termociclador Veriti 96-well (Thermofisher®).

1.4.3.2.5 Purificação

Os produtos de reação de Sanger serão purificados de acordo com um protocolo de precipitação de etanol e sal. Serão adicionados acetato de sódio (concentração final de 5 mM) e etanol 100% (3 volumes) ao produto de Sanger, para um volume final de 87 µL. A solução será incubada a 4 °C por 10 min e centrifugada a 18.000 g por 30 min. O sobrenadante será removido e o *pellet* será lavado ao centrifugar com etanol 80% em 4 °C com a mesma força, por 20 min. O processo será repetido duas vezes. Após a segunda lavagem, o *pellet* será seco em estufa a 50 °C e armazenado a 4 °C protegido da luz até o momento do sequenciamento.

1.4.3.2.6 Sequenciamento ABI

Os purificados do produto de Sanger serão ressuspensos em 10 µL de formamida Hi-Di (ThermoFisher®) e acondicionados em uma placa de 96 poços. A placa será submetida ao sequenciamento de eletroforese capilar no Applied Biosystems® 3500 xL Genetic Analyzer, onde as amostras serão injetadas para corrida no polímero POP-7 para 3500 xL Genetic Analyzer (ThermoFisher®).

1.4.3.2.7 Análise dos eletroferogramas (*basecalling*)

Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento serão analisados através dos programas/pacotes estatísticos STADEN Package v2.11b (Staden, Judge et al. 2003) e do Geneious Prime. Inicialmente, será obtida a sequência consenso a partir dos eletroferogramas das fitas F e R de cada uma das amostras, utilizando o Pre-Gap4 e Gap4 implementados no STADEN Package. O *basecalling* é feito de acordo com a qualidade da leitura de cada uma das bases que o sequenciador retorna, e o fragmento é cortado de acordo com um padrão pré-estabelecido de qualidade de acima de 95% de confiança. Será realizada a comparação do corte entre os algoritmos do STADEN Package e o Geneious Prime. A fase gamética será estimada utilizando o PHASE v.2.1 (Stephens, Smith et al. 2001). As sequências serão adicionadas a um banco de dados referência que contém a respectiva sequência de cada espécie, que será utilizada para as análises de metagenômica, em formato fasta.

Além de compor o banco de dados de sequências de DNA do projeto, as sequências obtidas poderão ser inseridas no GenBank e disponibilizadas para toda a comunidade científica. Tal disponibilização será realizada caso haja consentimento formal por parte da Sanepar.

1.4.3.2.8 Árvore filogenética

Uma árvore filogenética é uma representação gráfica que demonstra a relação evolutiva entre diferentes espécies ou grupos de organismos. Essas árvores são usadas na biologia para ilustrar como as diferentes formas de vida estão relacionadas entre si com base em características genéticas, morfológicas ou outras.

Para a construção da árvore filogenética das espécies cujas sequências do gene de interesse compõe o banco de dados do projeto, será utilizado o programa *online* Mafft (Kuraku, Zmasek et al. 2013), usando as opções padrões de alinhamento (mafft -reorder --anysymbol --auto input). Tal árvore filogenética (exemplo na Figura 7) será gerada por meio do alinhamento de escores para produzir uma distância aproximada da filogenia das espécies utilizando o método UPGMA (método de grupo de pares não ponderados com média aritmética que gera um agrupamento hierárquico aglomerativo simples (Han and Zmasek 2009)). A figura será gerada utilizando os programas Archeopyterix (Zmasek and Eddy 2001) e FigTree v.1.4.4 (Rambaut and Drummond 2012).

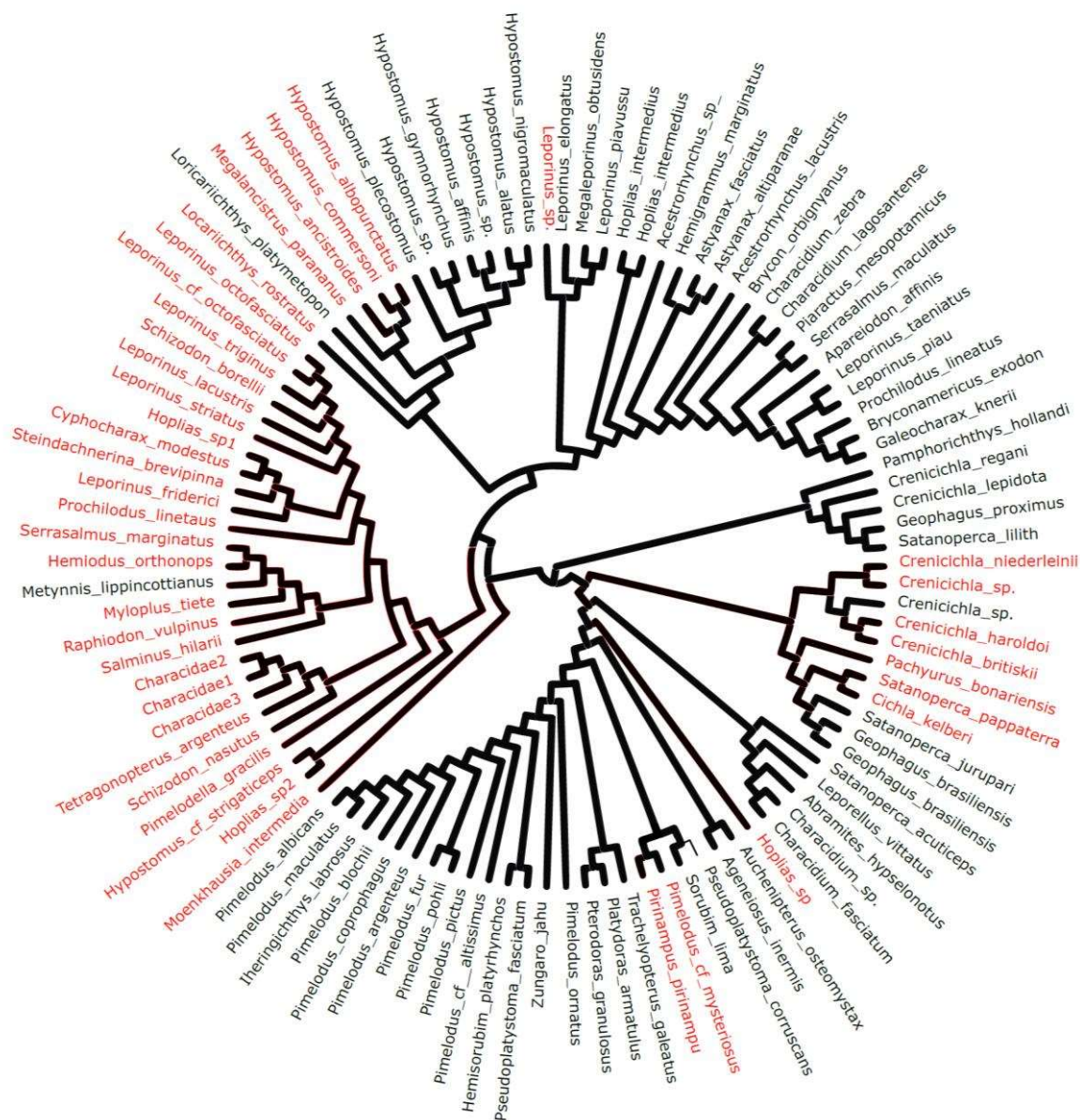


Figura 7. Exemplo de árvore filogenética das espécies sequenciadas (vermelho) e das espécies cuja sequências foram obtidas no GenBank (preto) para compor o banco de dados de referência do projeto.

1.4.3.3 Análise Molecular – Metabarcoding

O sequenciamento *metabarcoding* é uma técnica poderosa utilizada na área da biologia molecular para analisar a diversidade de organismos presentes em uma amostra ambiental, como solo, água, ar ou amostras biológicas. Ele se baseia na amplificação e sequenciamento de regiões genéticas específicas, chamadas de

"*barcodes*" ou "marcadores", que são encontradas em uma ampla variedade de organismos.

No presente projeto serão realizadas análises de *metabarcoding* de amostras de água coletadas em diferentes reservatórios e ambientes aquáticos dulcícolas definidos pela Sanepar. Após os procedimentos de coleta, fixação e armazenamento, as amostras serão submetidas a análise molecular de *metabarcoding*. Os procedimentos laboratoriais detalhados da metodologia analítica são descritos abaixo.

1.4.3.3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA, os filtros serão mantidos em temperatura ambiente para que o etanol residual evapore por completo e, então serão processados seguindo os procedimentos de extração utilizando *beads* magnéticas (microesferas envolvidas por magnetita e carboxila), que se ligam ao DNA (ligação carboxila – DNA). Esse processo de extração de DNA é denominado de Imobilização Reversível de Fase Sólida (SPRI) e já foi adaptado para amostras de ambientes aquáticos dulcícolas por pesquisadores da ATGC (Dal Pont, Duarte Ritter et al. 2021, Ritter, Dal Pont et al. 2022). Após esse processo, é possível separar as partículas de DNA das de não-DNA. A quantidade de DNA obtida na extração será quantificada por espectroscopia e fluorometria. O extrato de DNA será armazenado a - 20 °C até o momento das análises de sequenciamento. Para a garantia dos resultados, os processos de extração e de quantificação serão realizados em salas separadas, como recomendado por Pie, Stroher et al. (2017).

1.4.3.3.2 Sequenciamento genético - *Metabarcoding*

As bibliotecas de sequenciamento serão preparadas de acordo com a metodologia de PCR de fusão. Essa metodologia consiste na realização de uma PCR aninhada, em que a segunda etapa possui um fragmento extra após o sítio de anelamento do *primer* da primeira etapa. Este fragmento extra é incorporado na molécula ao ocorrer a síntese, e possui regiões com funções específicas durante o sequenciamento (Elbrecht, Taberlet et al. 2016). O conjunto dessas regiões é chamado de adaptador do Illumina®, e suas sub-regiões consistem em: i) uma região que hibridiza

com o oligonucleotídeo na célula de fluxo do sequenciador; ii) um sítio de anelamento do *primer* de sequenciamento do index da amostra; iii) uma região de oito pares de base variável, com sequência conhecida, onde é adicionada uma sequência única em todas as moléculas da mesma amostra a fim de identificar individualmente estas moléculas e iv) o sítio de anelamento do *primer* de sequenciamento do fragmento de interesse.

A primeira PCR será realizada utilizando as concentrações finais dos reagentes apresentados na Tabela 2, com volume final de 25 µL. A sequência dos *primers* utilizados nesta etapa e as condições do ensaio da PCR serão definidos após a execução dos testes laboratoriais. O resultado da PCR será verificado em gel de agarose 1.5% em tampão TBE (9 mM TRIS, 9 mM ácido bórico, 1 mM EDTA), corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (ThermoFisher Scientific®). Réplicas das amostras de cada ponto de coleta serão amplificadas para aumentar a chance de detecção de espécies raras. O produto de PCR será diluído (até 100x), e a diluição utilizada como molde para a adição dos adaptadores na segunda PCR (Elbrecht and Leese 2015).

Tabela 2. Condições da PCR Endpoint

Reagente (matriz)	Concentração final
Cloreto de magnésio	4 mM
TaqPlatinum DNA polimerase	1 U
TaqPlatinum PCR Buffer	1 X
Mistura de dNTPs	1 mM
Primers MiFish U-F/R	1 µM de cada

A PCR aninhada ocorrerá com as concentrações finais de reagentes apresentados na Tabela 3, com volume final de 10 µL. A sequência de identificação das amostras utilizada durante essa etapa é apresentada na Tabela 4. As condições do ensaio serão, conforme especificações do fabricante do sistema Illumina®, de 95 °C por 3 min, 12 ciclos de 98 °C por 12 s e 72 °C por 15 s (anelamento e extensão combinados), seguido de um passo final de 72 °C por 5 min.

Tabela 3. Condições da PCR de fusão.

Reagente (matriz)	Concentração final
Cloreto de magnésio	4 mM
TaqPlatinum DNA polimerase	1 U
TaqPlatinum PCR Buffer	1 X
Mistura de dNTPs	1 mM
Primers MiFish U-F/R + Adaptadores + Índice	5 µM de cada

Tabela 4. Estrutura e sequência dos primers de fusão para a adição dos adaptadores. Amarelo – Adaptador da célula de fluxo (i5 e i7), Verde – Índices degenerados para a detecção de duplicatas de PCR, Azul – Índice de identificação de amostra e Rosa – Primer de sequenciamento.

Primer	Sequência
Foward	5-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACANNNNXXXXXXXXPRIMER-3
Reverse	3-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXPRIMER-5

As moléculas de DNA de uma mesma amostra serão artificialmente marcadas com sequências previamente conhecidas e denominadas de índices. A adição desses marcadores ocorre em ambas as extremidades, 5' e 3' dos fragmentos de DNA. No adaptador de cada extremidade é adicionada uma sequência única, que será lida com o fragmento durante o sequenciamento. Como o sequenciamento ocorre em ambas as direções (5'→3', e 3'→5' pelo sistema de amplificação em ponte), em cada extremidade é adicionado um índice diferente. A combinação destes índices em ambas as extremidades, após o sequenciamento, é o indicador da identidade da amostra. Cada amostra receberá uma combinação de marcadores única. Para otimizar o ensaio, os índices individuais podem ser repetidos entre as amostras, mas as combinações serão sempre únicas. A Tabela 5 apresenta a identificação e a sequência de pares de bases dos índices comerciais que serão utilizados. A Figura 8 apresenta a relação de combinações de índices na placa de 96 amostras do Kit de sequenciamento MiSeq V3 Illumina®. Com o objetivo de aumentar a qualidade das leituras, será realizado um *spike* do genoma viral PhiX (Illumina®) na proporção de 10%.

Tabela 5. Índices utilizados na preparação da biblioteca e suas respectivas sequências para posterior decodificação.

Índice	Sequência
i7 H 701	TCGCCTTA
i7 H 704	GCTCAGGA
i7 H 705	AGGAGTCC
i7 H 707	GTAGAGAG
i7 H 710	CAGCCTCG
i7 H 715	CCTGAGAT
i7 H 723	GAGCGCTA
i7 H 728	TAGCTGCA
i5 E 501	TAGATCGC
i5 E 502	CTCTCTAT
i5 E 503	TATCCTCT
i5 E 504	AGAGTAGA
i5 E 505	GTAAGGAG
i5 E 506	ACTGCATA
i5 E 507	AAGGAGTA
i5 E 508	CTAAGCCT
i5 E 510	CGTCTAAT
i5 E 511	TCTCTCCG
i5 E 513	TCGACTAG
i5 E 515	TTCTAGCT

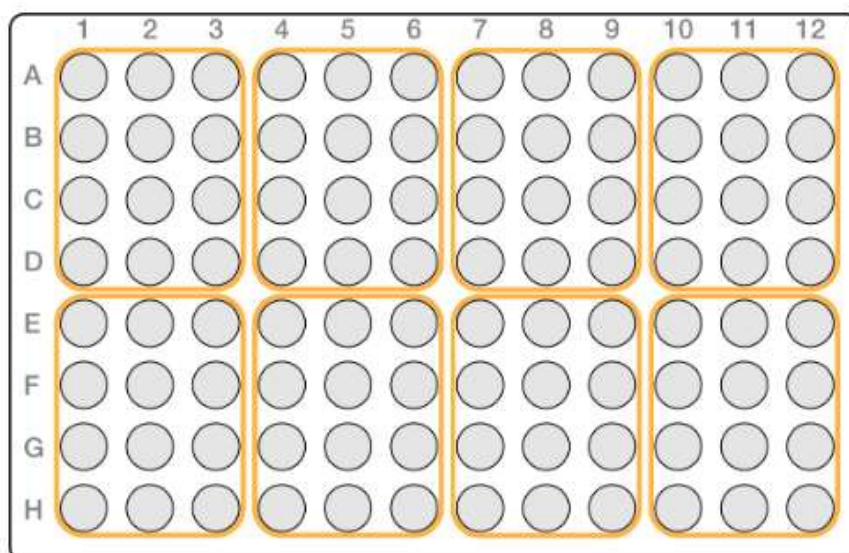


Figura 8. Esquema de combinação de índices. Cada área laranja utiliza um índice F único, seguido de um índice R para cada amostra dentro das áreas.

Durante o processo de amplificação do gene de interesse, na etapa denominada de pré-PCR, espera-se que todos os moldes (fita forward ou reverse) sejam igualmente amplificados. Entretanto, podem ocorrer variações estocásticas por um molde ser mais amplificado que o outro. Devido à natureza exponencial da PCR, se essa variação ocorre nos primeiros ciclos, ao final da amplificação, um molde estará muito mais representado (em maior quantidade de fitas) do que outro. Por esse motivo, aos oito pares de bases dos índices serão adicionados quatro pares de bases degenerados (contendo aleatoriamente cada um dos quatro nucleotídeos, em mesma frequência, em cada posição) ao índice, com o objetivo de detectar duplicatas de PCR (Tin, Rheindt et al. 2015, Elbrecht, Hebert et al. 2018). Como estas quatro bases ocorrem com a mesma frequência, espera-se que ao final da amplificação, sua frequência permaneça idêntica. Caso ocorra duplicata de PCR no processo, algumas combinações serão mais amplificadas e sequenciadas do que outras. Isto permitirá identificar quais sequências estão super-representadas devido às duplicatas. *Primers* degenerados consistem em uma ou mais posições da molécula em que o nucleotídeo é genérico. Na prática, são sintetizadas versões diferentes do mesmo *primer*, onde naquela posição, ocorrem tanto moléculas com um nucleotídeo N1, quanto moléculas com um nucleotídeo N2. Nesse cenário, a matriz possui moléculas com todas as possíveis combinações destas bases degeneradas. No contexto do desenho deste *primer*, uma matriz possui 4 (posições) vezes 4 (possíveis nucleotídeos) vezes 4 (combinações) diferentes versões do mesmo *primer*, na mesma frequência, na mesma solução. Assim, esses *primers* sempre incorporam um índice fixo de identificação na molécula, seguido de 1 em 64 dos detectores de duplicata de PCR. Em contexto de *metabarcoding*, a adição dessa etapa metodológica evita que um erro sistemático de amplificação no sequenciamento leve à interpretação equivocada de que uma espécie ocorre em maior frequência e quantidade que outras.

1.4.3.3.3 Bioinformática

Após o sequenciamento, as amostras serão analisadas por bioinformática. A primeira etapa se caracteriza pela aplicação de um filtro de qualidade, o CHASTITY, que é inserido no próprio Illumina MiSeq para que as sequências de baixa qualidade sejam removidas. A segunda etapa é a identificação das amostras pela sua combinação de índices. Ela é feita pelo filtro *illumina-pairend*, alimentado com uma tabela contendo a identidade da amostra e seus respectivos índices. Na terceira etapa, serão removidas as sequências dos adaptadores nas extremidades 5' e 3' utilizando o filtro *cutadapt*. Após isso, as sequências serão cortadas para o tamanho do marcador molecular utilizando o *prinseq*. Será realizada a detecção de duplicatas de PCR com o *clumpify* (Bushnell, Rood et al. 2017) e *rmdup* (Li, Handsaker et al. 2009) e, posteriormente, a desreplicação das sequências com o *obiuniq*. Então, um último filtro de qualidade será aplicado ao banco de dados (*obiclean*).

Uma fase de extrema importância para a análise de dados metagenômicos está relacionada à “limpeza” das sequências obtidas. Nessa fase as “porções” da sequência referentes à síntese na região do *primer* e à presença de quimeras devem ser removidas para a obtenção de sequências de qualidade. Para remover os *primers* utilizamos o pacote *cutadapt* (Martin 2011) no programa Python v.3.3 (Van Rossum and Drake 2009). Em seguida, utilizamos o pacote DADA2 (Callahan, McMurdie et al. 2016) no *software* R v. 4.0.2 (Team 2020) para remover quimeras, filtrar as sequências por qualidade e definir as sequências chamadas de “*Amplicon Sequence Variants*” (ASVs).

1.4.3.3.4 Análise de sequência e avaliação taxonômica

Após as etapas de controle de qualidade, será realizada a análise de agrupamento das sequências com suas respectivas identidades taxonômicas. Com essa etapa será possível relacionar sequências de DNA específicas a uma identidade taxonômica. Existem várias metodologias distintas para a realização dos agrupamentos de sequências de DNA. As *MOTUs* (Molecular Operational Taxonomic Unit) são as sequências de DNA agrupadas em uma similaridade de 97% obtidas no sequenciamento e as ASVs (Amplicon Sequence Variant) são as sequências únicas de DNA obtidas no sequenciamento. Primeiramente serão filtradas por qualidade as

sequências “*foward*” e “*reverse*” de cada amostra usando as taxas de erro específicas de cada grupamento de sequências (*MOTUs* ou *ASVs*). Para isso, excluiremos as sequências com bases ambíguas ($\text{maxN} = 0$) e cada sequência “*foward*” deverá apresentar menos que 3 erros esperados e as sequências “*reverse*” menos de 5 - com base em seus escores de qualidade ($\text{maxEE} = c(3,5)$, $\text{truncQ} = 2$). Para o emparelhamento das sequências, consideraremos um valor mínimo de 12 pb de sobreposição e excluiremos sequências com incompatibilidades na região de sobreposição. A escolha do método de estabelecimento dos grupamentos de sequências de DNA obtidos vai depender de características específicas dos grupos zoológicos estudados, do comportamento e eficiência do *primer* (alvo) e de outras características de qualidade das sequências obtidas. Após o estabelecimento dos grupamentos (*MOTUs* ou *ASVs*) os resultados serão comparados com a lista de espécies e sequências no banco de dados referência.

1.4.3.3.5 Posicionamento filogenético

Para inferência taxonômica, utilizamos o banco de dados de referência criado especificamente para o projeto. Com o banco de sequências de referências, será realizada a avaliação da composição taxonômica dos grupamentos de sequências usando a função “*Blastn*” do programa de mesmo nome com e-value de 0.001 no Python.

A inferência taxonômica das espécies contidas no nosso banco de dados aos grupamentos de sequências obtidas pelo sequenciamento Illumina® será realizada por meio da determinação de medidas de similaridade da sequência referência (banco de dados) e posterior atribuição da espécie para cada grupamento gerado. No entanto, as abordagens baseadas na similaridade de sequência não usam ou fornecem informações filogenéticas sobre o grupamento de sequência gerado – geralmente para *ASVs*. Isso pode diminuir a precisão da identificação (Koski and Golding 2001), especialmente quando os grupamentos são apenas remotamente relacionadas à referência taxonômica presente no banco de dados. Isso pode ocorrer, por exemplo, quando a espécie mais estreitamente relacionada ao grupamento simplesmente não está disponível no banco de dados. Os algoritmos de posicionamento filogenético

aliviam esse problema, colocando o grupamento em uma árvore de referência inferida em um determinado conjunto de sequências de referência. Isso permite a identificação de ASVs ou *MOTUs* levando em consideração a história evolutiva das sequências. Utilizando essa abordagem, usaremos as sequências do nosso banco de referência para criar uma árvore de referência e assim evidenciar o posicionamento filogenético dos grupamentos de sequências gerados. O alinhamento das sequências com os dados do banco de referência será realizado utilizando o PaPaRa 2.0 algoritmo (Berger and Stamatakis 2012). Finalmente, usaremos o programa EPA 0.3.3 (Barbera, Kozlov et al. 2019) para produzir o posicionamento filogenético de cada grupamento de sequência gerado.

1.4.3.3.6 Análises estatísticas

Todas as análises serão executadas no *software* R, usando R Studio (Team 2020). O pacote tidyverse v. 1.3.0 (Wickham 2017) será utilizado para curadoria de dados e os pacotes ggplot2 v. 3.3.2 (Wickham 2016) e dendextend v. 1.14.0 (Galili 2015) para visualização de dados. Como as estimativas de riqueza podem ser influenciadas por grupamentos de sequências raras (Haegeman, Hamelin et al. 2013), calcularemos, além do número de ASVs ou *MOTUs* por ponto, a estimativa de Chao1 (que usa a rarefação para estimar a riqueza em cada ponto) e a diversidade de Fisher (ou seja, a relação entre o número de grupamentos em qualquer ponto amostrado e o número de sequências) usando o pacote phyloseq (McMurdie and Holmes 2013).

Além das análises de diversidade, também construiremos uma ordenação de escalonamento multidimensional não métrico bidimensional (NMDS) das matrizes de abundância (número de sequências) dos grupamentos. Primeiro transformaremos os dados de número de sequências em proporções, de acordo com a demanda matemática para o cálculo do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Para isso, aplicaremos a função "transform_sample_counts" no pacote phyloseq, e usaremos a função "ordination" com o método NMDS e distância de Bray-Curtis no pacote phyloseq para analisar a dissimilaridade da comunidade entre todas as amostras. Adicionalmente, construiremos um dendograma usando a opção '*hclust*' em do pacote

dendextend v. 2.4-3 (Oksanen, Blanchet et al. 2013), que implementa o agrupamento hierárquico das matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis.

1.4.4 Banco de dados georreferenciado

Todos os dados de caracterização taxonômica e posicionamento filogenético gerados ao longo do projeto serão apresentados à Sanepar de forma sistematizada. Estes serão disponibilizados de forma eletrônica e atualizados conforme frequência de amostragem e coletas estabelecida no plano de trabalho (o plano de trabalho poderá ser revisado após a contratação para incorporar demandas da Sanepar quanto as características/formato de estruturação e apresentação do banco de dados georreferenciados). Os dados de coleta irão conter coordenadas geográficas e código SIA (codificação adotada pela própria Sanepar), data e hora da coleta e valor da medida e unidade padronizada. Os dados de coleta e sequenciamento genético serão disponibilizados de forma que possam ser diretamente incorporados ao banco de dados da Sanepar.

1.4.5 Banco de amostras

As amostras para formação do banco de amostras serão coletadas juntamente com as amostras que serão destinadas a análise molecular por sequenciamento genético. Serão realizadas 9 (nove) campanhas amostrais (coletas sazonais a cada 3 meses) ao longo do período de vigência do projeto. Nos 81 pontos amostrais será coletada uma amostra de eDNA destinada a formação do banco de amostras. No total, 729 amostras vão compor o banco de amostras do projeto.

Após coleta, filtragem e fixação, as amostras coletadas no campo e destinadas a formação do banco de amostras serão encaminhadas ao laboratório da ATGC Genética Ambiental em Curitiba, Paraná. Essas amostras serão cadastradas no sistema de gestão de amostras da ATGC e receberão identificações individuais contendo todas as informações referentes ao local de coleta, data, metodologia de coleta e fixação, informações das características físico-químicas da água no momento da coleta, entre outras. Após a identificação individual das amostras, elas serão

acondicionadas em caixas devidamente identificadas, e serão acondicionadas em ultra freezer (-80 °C) durante toda a vigência do projeto.

Além de servirem como réplica ou contraprova das amostras coletadas e analisadas ao longo do período de vigência do projeto, as amostras do banco poderão servir como um registro pretérito para avaliação ambiental da ocorrência de outros grupos de animais ou também para novos estudos/análises. Ao final do período de vigência do projeto, conforme descrito no Edital N° 001/2023 GHID (página 46), caso seja de interesse da SANEPAR, a extensão do prazo de manutenção do banco de amostras poderá ser objeto de termo específico de ajuste do convênio.

1.4.6 Divulgação dos resultados

Além dos relatórios técnicos que serão apresentados a Sanepar, serão elaboradas outras formas de divulgação dos resultados obtidos no projeto. O objetivo dessa divulgação é levar os resultados obtidos, utilizando linguagem acessível, a diferentes áreas da Sanepar e da sociedade em geral.

Com base nos principais resultados obtidos, serão elaborados *folders* para a distribuição na Sanepar e para a população em geral. Ao final do projeto, será elaborada uma revista de divulgação científica de todos os resultados/produtos gerados ao longo da vigência do projeto. Assim como o folder, os textos apresentados na revista serão elaborados com linguagem acessível para o público em geral. Esses materiais serão entregues a Sanepar diagramados e de forma virtual. Caso considere pertinente, a Sanepar poderá realizar a impressão e distribuição do material impresso.

Ao final do projeto, a ATGC se disponibiliza para apresentar os resultados obtidos, no formato de palestra presencial, para as diferentes áreas da Sanepar, em evento único organizado pela Sanepar. O objetivo, é contextualizar os resultados obtidos e orientar os colaboradores da Sanepar quanto a interpretação dos resultados e da importância da metodologia desenvolvida.

1.4.7 Solicitação de patente de invenção

Após a validação dos procedimentos analíticos de validação dos primers de sequenciamento e aplicação em campo da metodologia (coletas nos reservatórios da Sanepar), poderá ser realizada a solicitação da patente de invenção da metodologia desenvolvida. Regida pela Lei da Propriedade Industrial nº 9279/1996 (LPI), e pelas Instruções Normativas 30/2013 e 31/2013, a solicitação de patente destina-se à pessoa física ou jurídica que deseja requerer uma patente de invenção de uma nova tecnologia para um produto ou processo. Essa invenção ou tecnologia deve atender aos requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial descritos na legislação vigente.

Para fazer a solicitação de registro de patente no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) no Brasil, serão seguidos os seguintes passos:

1. **Preparação da Documentação:** elaboração de documento com a descrição detalhada da invenção, incluindo informações técnicas e funcionais, reivindicações específicas sobre a invenção, definindo os aspectos únicos e inovadores e resumo que forneça uma visão geral da invenção.
2. **Realização de busca de anterioridade:** antes de enviar a solicitação, será realizada uma busca de anterioridade para verificar se a invenção já foi registrada ou está em processo de registro por outra pessoa/empresa.
3. **Solicitação de Patente junto ao INPI:** serão preenchidos todos os formulários com as informações solicitadas, incluindo detalhes da invenção, dados do inventor e qualquer outra informação necessária. Serão apresentados documentos como a descrição detalhada, reivindicações, desenhos e resumo. Na sequência será realizado o pagamento das taxas de depósito e tramitação do pedido de patente.
4. **Acompanhamento e Exame:** após o depósito da solicitação, ela passará por um processo de avaliação quanto à novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. Pode haver comunicações entre o examinador e o requerente, e ajustes podem ser solicitados.
5. **Concessão da Patente:** se a invenção atender a todos os requisitos de patenteabilidade e passar pelo processo de exame, a patente será concedida.

Após a concessão, é necessário efetuar o pagamento de taxas de manutenção anual para manter a validade da patente. Vale ressaltar que o processo de registro de patente pode ser complexo e pode variar dependendo da natureza do método e de

outros fatores. Para evitar quaisquer problemas relacionados a patente, a ATGC contratará serviço terceirizado especializado em propriedade intelectual. O objetivo é garantir que todos os aspectos legais sejam devidamente tratados ao longo do processo.

O tempo total para obtenção do registro de patente pode variar muito, e fatores como a complexidade da invenção, características da documentação, a necessidade de ajustes e a fila de exames podem afetar a duração do processo. Em alguns casos, o período entre o depósito (solicitação) e a concessão da patente pode demorar vários anos. Por esse motivo, a ATGC se compromete, ao final do projeto, em realizar a solicitação ou depósito de solicitação da patente, bem como as taxas envolvidas nesse processo. Isso porque a concessão, propriamente dita, pode demorar mais tempo que o período de vigência do projeto.

1.5 Produtos a serem entregues

Ao longo do período de execução do projeto serão entregues a Sanepar vários produtos oriundos da execução das atividades de pesquisa e monitoramento molecular dos corpos hídricos. O primeiro produto a ser entregue será o plano de trabalho atualizado, conforme descrição no item 4 do Edital N° 001/2023 GHID (página 48/66).

Conforme descrito no item 4.4.4 (Acompanhamento dos trabalhos – página 54/66) o acompanhamento dos trabalhos será realizado por meio da emissão de relatórios técnicos, parciais ou completos, em que, nas datas previstas no cronograma de atividades, será encaminhado o relatório, para a avaliação da Sanepar. Ao longo do projeto serão elaborados 19 relatórios parciais e 01 relatório final (conforme detalhamento no cronograma de atividades).

Os produtos relacionados aos objetivos específicos detalhados no edital n° 001/2023 GHID (destacados em verde na Figura 1) **Erro! Fonte de referência não encontrada.** serão entregues no contexto dos relatórios parciais e final. Adicionalmente, arquivos específicos contendo os produtos serão disponibilizados para a Sanepar.

Abaixo, apresentamos individualmente os produtos a serem entregues:

- a. **Validação da metodologia de coleta e sequenciamento:** o produto será entregue no segundo relatório parcial (mês 6/36). Os resultados de validação metodológica serão utilizados para compor a descrição da patente (produto do item g);
- b. **Amostras para análise e curadoria do banco de amostras:** o produto referente à coleta de amostras será apresentado ao longo da execução do projeto nos relatórios parciais dos meses 06, 09, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30. O banco de amostras será apresentado nos relatórios parciais dos meses 08, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32 e no relatório final (mês 36).
- c. **Resultados das análises de metabarcoding:** serão apresentados os resultados de frequência e abundância relativa de bactérias (e cianobactérias) e zooplâncton, ao longo da execução do projeto, nos relatórios parciais dos meses 08, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32. Tais resultados serão utilizados para compor o banco de dados georreferenciado.
- d. **Banco de dados georreferenciado:** o formato de envio dos dados que irão compor o banco de dados georreferenciados serão estipulados pela Sanepar após a assinatura do convênio. Os dados serão disponibilizados nos relatórios parciais dos meses 08, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32 e no relatório final (mês 36). A ATGC se compromete a realizar a curadoria, formatação e disponibilização dos dados.
- e. **Banco de amostras:** o processo de estruturação, montagem e manutenção do banco de amostras será apresentado nos relatórios parciais dos meses 08, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32 e no relatório final (mês 36).
- f. **Divulgação dos resultados:** a ATGC irá elaborar formas de divulgação dos resultados do projeto visando a comunicação com diferentes áreas da Sanepar e da sociedade em geral. Tais formas de divulgação contemplam documentos técnicos (relatórios parciais e final), elaboração de revista digital e apresentação dos resultados em formato de palestra. A ATGC não se responsabiliza pela impressão e veiculação dos documentos disponibilizados. Os produtos serão entregues nos relatórios parciais dos meses 14 e 26 e no relatório final (mês 36).

- g. Patente:** Uma vez que a solicitação de depósito de patente deve ser realizada pela empresa responsável, neste caso, a Sanepar, a ATGC dará suporte técnico ao processo de requerimento de patente dos resultados obtidos. Aqui, vale ressaltar que uma empresa de consultoria legal será contratada para dar suporte à esse processo.

1.6 Cronograma de atividades

Abaixo, na Tabela 6, apresentamos o cronograma mensal de atividades previstas no projeto.

Tabela 6. Cronograma de atividades previstas para execução do projeto. Os meses marcados em cinza representam o período de execução da etapa/objetivo. Em amarelo, são marcados os meses em que será realizada a avaliação dos relatórios de atividades pela Sanepar.

Objetivo/Atividade	2023												2024												2025												2026											
	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36												
Elaboração e revisão do CTCF																																																
Objetivo a - Testes																																																
Objetivo b - Coletas																																																
Objetivo c - Análises genéticas																																																
Objetivo d - Banco de dados																																																
Objetivo e - Banco de amostras																																																
Objetivo f - Divulgação																																																
Objetivo g - Patente																																																
Relatório parcial																																																
Relatório final																																																

Proposta Orçamentária

CHAMAMENTO PÚBLICO Nº 001/2023 GHID



**Projeto Y va´e - Desenvolvimento de
ferramentas metodológicas para
monitoramento biológico dos mananciais
de abastecimento**

1 Proposta de Preço (PP)

1.1 Orçamento

O valor proposto para a execução do Termo de Cooperação Técnica-Científica e Financeira (TCTCF) (edital Nº 001/2023 GHID) é de R\$ 4.099.754,00 (Quatro Milhões, Noventa e Nove Mil e Setecentos e Cinquenta e Quatro Reais). Neste valor já estão inclusos todos os custos, taxas, impostos, custos de contratações, licitações, despesas operacionais, administrativas ou para fundo de projetos institucionais. Na Tabela 1 é apresentado o valor global proposto para o desenvolvimento do projeto.

Tabela 1. Valor total para execução do Termo de Cooperação Técnica-Científica e Financeira (TCTCF).

Objeto	Valor total (R\$)
Desenvolvimento de ferramentas metodológicas para monitoramento biológico dos mananciais de abastecimento	4.099.754,00

1.2 Cronograma de ações e repasse

O cronograma de ações e repasse (desembolso) foi elaborado de acordo com os objetivos listados no edital Nº 001/2023 GHID:

Objetivo a) Realizar testes de laboratórios, em mesocosmos e/ou a campo para os ajustes necessários na metodologia de análises biológicas em ambientes límnicos;

Objetivo b) Realizar as coletas de amostras de água nos reservatórios ou estações de tratamento de água definidas pela SANEPAR;

Objetivo c) Realizar análises genéticas moleculares em amostra de água in natura oriundas de mananciais e reservatórios, para monitoramento da presença e da frequência relativa das respectivas espécies (ou ao menor nível taxonômico possível), em pontos definidos pela SANEPAR, bem como utilizar a mesma metodologia para

caracterizar as comunidades faunísticas, zooplanctônicas e de cianobactérias de interesse, presentes nas captações de água da SANEPAR no Estado do Paraná;

Objetivo d) Criar e Manter, durante toda a vigência do Convênio, um banco de dados georreferenciado, com os dados e informações gerados sobre o monitoramento descrito no item 3 (acima), relativos às captações de água in natura da SANEPAR;

Objetivo e) Estruturar, montar e manter, em suas próprias instalações e durante toda a vigência do Convênio, um banco de amostras de e-DNA obtidas em cada coleta e em cada ponto amostral durante toda a vigência do Convênio. Esse banco permitirá que, caso haja interesse ou necessidade da SANEPAR, novos estudos/análises possam vir a ser realizados a partir dessas mesmas amostras já previamente coletadas;

Objetivo f) Preparar formas de divulgação dos resultados do projeto, visando a comunicação dos resultados as diferentes áreas da companhia, e a sociedade em geral;

Objetivo g) Requerer a patente de invenção, da nova tecnologia para o produto desenvolvido para a SANEPAR, o qual deve atender aos requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial.

1.2.1 Valor total e percentual de desembolso

Abaixo, são apresentados o valor total do projeto e os valores individuais de cada objetivo proposto (Tabela 2). Adicionalmente são apresentados os valores percentuais relativos à execução de cada objetivo. Atendendo ao item 6.3 do Anexo I – Termo de Referência (página 36/66) o valor percentual do item 0 (Elaboração e revisão do CTCF) é inferior à 10% do valor total da proposta (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição orçamentária total, por objetivos e valores percentuais (%) previstos para execução do projeto.

CHAMADA PÚBLICA 001/2023 - LOTE 01			
Tabela de Valores para Desembolso			
ITEM	OBJETIVO/ATIVIDADE	PREVISTO	%
0	Elaboração e revisão do CTCF	380.602,86	9,3
1	Objetivo a - Testes	289.813,88	7,1
2	Objetivo b - Coletas	1.049.458,80	25,6
3	Objetivo c - Análises genéticas	1.868.650,90	45,6
4	Objetivo d - Banco de dados	196.218,30	4,8
5	Objetivo e - Banco de amostras	196.218,30	4,8
6	Objetivo f - Divulgação	76.030,41	1,9
7	Objetivo g - Patente	42.760,56	1,0
8	Total TCTCF	4.099.754,00	100

1.2.2 Cronograma de desembolso mensal

Utilizando o modelo de apresentação proposto no edital Nº 001/2023 GHID (item 6.3, página 36/66) é apresentado abaixo o cronograma mensal de desembolso para a execução total do projeto. O projeto será realizado em período total de 36 meses (3 anos). Para facilitar a visualização do cronograma de desembolso, as tabelas referentes ao ano 01 (Tabela 3), ano 02 (Tabela 4) e ano 03 (Tabela 5) são apresentadas individualmente.

Tabela 3. Cronograma de desembolso referente ao ano 01 (meses 1-12) de execução do projeto.

CHAMADA PÚBLICA 001/2023 - LOTE 01			CRONOGRAMA FÍSICO											
Tabela de Valores para Desembolso		Previsto	1 dez/23	2 jan/24	3 fev/24	4 mar/24	5 abr/24	6 mai/24	7 jun/24	8 jul/24	9 ago/24	10 set/24	11 out/24	12 nov/24
Item	Objetivo/Atividade													
0	Elaboração e revisão do TCTCF	380.602,86		380.602,86										
1	Objetivo a - Testes	289.813,88						289.813,88						
2	Objetivo b - Coletas	368.801,28						118.491,24			118.491,24			131.818,80
3	Objetivo c - Análises genéticas	429.264,32								213.196,42			216.067,90	
4	Objetivo d - Banco de dados	53.896,00								32.512,26			21.383,74	
5	Objetivo e - Banco de amostras	53.896,00								32.512,26			21.383,74	
6	Objetivo f - Divulgação	-												
7	Objetivo g - Patente	-												
8	Total TCTCF - Ano 01	1.576.274,34	-	380.602,86	-	-	-	408.305,12	-	278.220,93	118.491,24	-	258.835,38	131.818,80
	Período de execução													
	Entrega/Análise Sanepar													

Tabela 4. Cronograma de desembolso referente ao ano 02 (meses 13-24) de execução do projeto.

CHAMADA PÚBLICA 001/2023 - LOTE 01			CRONOGRAMA FÍSICO											
Tabela de Valores para Desembolso														
Item	Objetivo/Atividade	Previsto	13 dez/24	14 jan/25	15 fev/25	16 mar/25	17 abr/25	18 mai/25	19 jun/25	20 jul/25	21 ago/25	22 set/25	23 out/25	24 nov/25
0	Elaboração e revisão do TCTCF	-												
1	Obj. 1 - Testes	-												
2	Obj. 2 - Coletas	488.633,93			131.818,80			110.252,38			110.252,38			116.310,37
3	Obj. 3 - Análises genéticas	838.983,26		207.390,19			215.068,74			210.501,13			206.023,20	
4	Obj. 4 - Banco de dados	79.329,95		18.789,36			21.317,91			21.016,97			18.205,71	
5	Obj. 5 - Banco de amostras	79.329,95		18.789,36			21.317,91			21.016,97			18.205,71	
6	Obj. 6 - Divulgação	40.723,53		40.723,53										
7	Obj. 7 - Patente	29.889,88											29.889,88	
8	Total TCTCF (Ano 02)	1.536.890,51	-	285.692,44	131.818,80	-	257.704,56	110.252,38	-	252.535,08	110.252,38	-	272.324,49	116.310,37
Período de execução														
Entrega/Análise Sanepar														

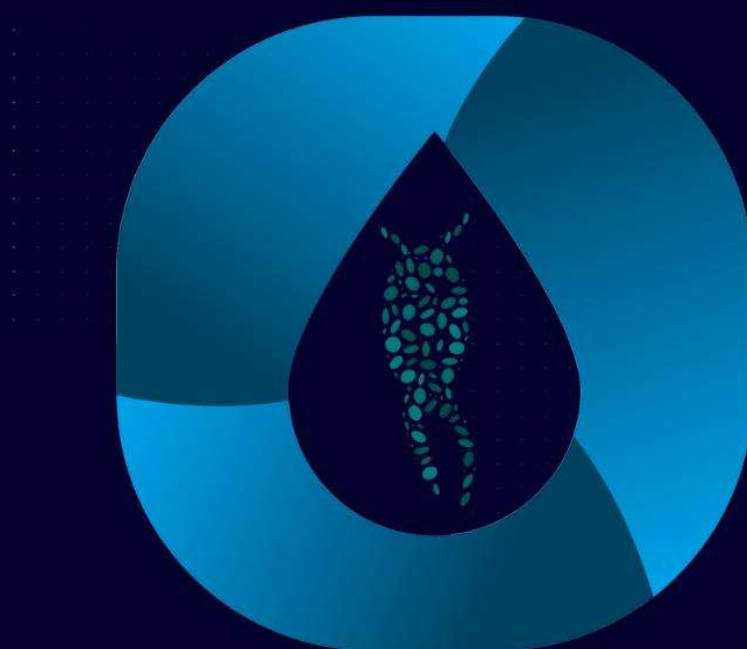
Tabela 5. Cronograma de desembolso referente ao ano 03 (meses 25-36) de execução do projeto.

CHAMADA PÚBLICA 001/2023 - LOTE 01			CRONOGRAMA FÍSICO											
Item	Objetivo/Atividade	Previsto	25 dez/25	26 jan/26	27 fev/26	28 mar/26	29 abr/26	30 mai/26	31 jun/26	32 jul/26	33 ago/26	34 set/26	35 out/26	36 nov/26
0	Elaboração e revisão do TCTCF	-												
1	Objetivo a - Testes	-												
2	Objetivo b - Coletas	212.023,59			109.040,79			102.982,80						
3	Objetivo c - Análises genéticas	600.403,32		194.231,19			204.434,78			201.737,35				
4	Objetivo d - Banco de dados	62.992,35		17.530,36			20.617,29			17.186,52				7.658,18
5	Objetivo e - Banco de amostras	62.992,35		17.530,36			20.617,29			17.186,52				7.658,18
6	Objetivo f - Divulgação	35.306,88		27.564,53										7.742,34
7	Objetivo g - Patente	12.870,69								12.870,69				
8	Total TCTCF - Ano 03	986.589,16	-	256.856,45	109.040,79	-	245.669,36	102.982,80	-	248.981,07	-	-	-	23.058,70
Período de execução														
Entrega/Análise Sanepar														

2 Prazo de execução

O prazo total de execução do Convênio será de 36 meses, com início a contar a partir da data de sua assinatura, atendendo o item 6.2 do Anexo I (Termo de Referência, página 35/66). O período para obtenção e análise de amostras de água em reservatórios e bacias onde estão instaladas as ETAs será de 28 meses, divididos em 9 campanhas amostrais (uma a cada estação do ano). Serão utilizados 5 meses no início do Convênio para mobilização da infraestrutura e desenvolvimento da metodologia (antes do início das campanhas amostrais) e 3 meses para a finalização das análises laboratoriais, elaboração do relatório técnico final, bem como para a prestação final de contas (no período posterior à última campanha amostral).

Objeto:	CHAMAMENTO PÚBLICO Nº 001/2023 GHID – PARA ESTABELECIMENTO DE TERMOS DE COOPERAÇÃO TÉCNICA-CIENTÍFICA E FINANCEIRA (CTCF)
Proposta:	Desenvolvimento de ferramentas metodológicas para monitoramento biológico dos mananciais de abastecimento.
Assinatura representante legal:	OTTO SAMUEL MADER NETTO:03742707914 Assinado de forma digital por OTTO SAMUEL MADER NETTO:03742707914 Dados: 2023.09.04 14:49:59 -03'00' MSc. Otto Samuel Mader Netto Diretor comercial e financeiro
Assinatura sócia:	ALINE HORODESKY: 06741934901 Assinado de forma digital por ALINE HORODESKY:06741934901 Dados: 2023.09.04 11:44:42 -03'00' Dra. Aline Horodesky Diretora técnica



YVA'E

Documento: **CE052024_PlanodeTrabalho_DNAAMBIENTAL_ATGCEP4.pdf**.

Assinatura Qualificada realizada por: **Julio Cesar Gonchorosky** em 08/04/2024 14:16, **Claudio Stabile** em 08/04/2024 16:29.

Assinatura Qualificada Externa realizada por: **Otto Samuel Mader Netto** em 02/04/2024 14:46.

Inserido ao protocolo **21.262.103-0** por: **Adriana de Souza Trigo** em: 02/04/2024 16:35.



Documento assinado nos termos do Art. 38 do Decreto Estadual nº 7304/2021.

A autenticidade deste documento pode ser validada no endereço:
<https://www.eprotocolo.pr.gov.br/spiweb/validarDocumento> com o código:
4aa6a2bf8b37d4ac15fed90b81ac46e4.