

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

RICARDO JESÚS LÓPEZ PARÍA

**REVELANDO A VARIAÇÃO DA COMUNIDADE DE
PEIXES ASSOCIADA AO RIVERSCAPE ATRAVÉS
DO MÉTODO DE METABARCODING DE DNA
AMBIENTAL**

SÃO CARLOS – SP
2025

RICARDO JESÚS LÓPEZ PARÍA

**REVELANDO A VARIAÇÃO DA COMUNIDADE DE PEIXES ASSOCIADA AO
RIVERSCAPE ATRAVÉS DO MÉTODO DE METABARCODING DE DNA
AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro
Manoel Galetti Junior

São Carlos-SP
2025

Paría, Ricardo Jesús López

Revelando a variação da comunidade de peixes associada ao riverscape através do método de metabarcoding de DNA ambiental / Ricardo Jesús López Paría -- 2025.
157f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Pedro Manoel Galetti Junior
Banca Examinadora: Alexandre Kannebley de Oliveira,
Sergio Maia Queiroz Lima
Bibliografia

1. Ecologia molecular. I. Paría, Ricardo Jesús López. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Ricardo Jesús López Paría, realizada em 28/02/2025:

Comissão julgadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Alexandre Kannebley de Oliveira (UFSCar)

Prof. Dr. Sergio Maia Queiroz Lima (UFRN)

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta jornada, muitas pessoas contribuíram direta e indiretamente para que esta dissertação se tornasse realidade, e a cada uma delas expresso minha mais profunda gratidão.

Em primeiro lugar, ao meu orientador, **Prof. Dr. Pedro Galetti Junior**, por seu apoio incondicional, seus conselhos valiosos e, acima de tudo, por acreditar em mim e me proporcionar a oportunidade de viver esta experiência acadêmica no Brasil. Sua orientação não apenas enriqueceu meu desenvolvimento como pesquisador, mas também me inspirou a seguir em frente diante dos desafios. Além de um mentor, encontrei nele um amigo e um exemplo de dedicação à ciência.

À minha companheira de vida, **Katia Aylas**, com quem compartilho mais de uma década de histórias, desafios superados e incontáveis momentos de alegria. Seu apoio inabalável, sua paciência e sua crença em mim foram pilares fundamentais para que eu pudesse crescer, tanto como pessoa quanto como pesquisador. Aos nossos filhos, que são minha maior motivação para seguir em frente e construir um futuro melhor, deixo meu mais sincero agradecimento. Parte do meu desejo de evoluir e avançar nesta caminhada vem do amor e do compromisso que sinto por eles.

À minha família, minha **mãe** e meu **pai**, que sempre foram minha base, meu refúgio e meu porto seguro. Seu amor incondicional, seu apoio constante e sua força me ajudaram a superar os momentos mais difíceis. Nas crises e incertezas, foram eles que estenderam a mão, me incentivaram e me deram os meios para seguir adiante. Sem vocês, este sonho não teria sido possível.

Ao pessoal do LabBMC, que, mesmo eu não sendo a pessoa mais extrovertida, sempre esteve disponível para me ajudar nos desafios que enfrentei ao lidar com temas novos. Em especial, agradeço a **Bruno Saranholi** e **Carla Gestich**, cuja experiência e generosidade foram fundamentais para tornar o ambiente de pesquisa mais colaborativo e enriquecedor.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada, seja com um conselho, um gesto de apoio ou simplesmente com sua presença, meu mais sincero agradecimento. Esta conquista não é apenas minha, mas de todos que me acompanharam ao longo do caminho.

O presente trabalho foi realizado no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (PPGERN/UFSCar).

O autor agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio institucional por meio do financiamento PROAP (Código de Financiamento 001) e pela concessão da bolsa de mestrado. Agradece também ao projeto "Avaliação, recuperação e conservação da fauna ameaçada de extinção do Centro de Endemismo Pernambuco (CEP)", financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2017/23548-2, cujo suporte foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

O uso antrópico da terra impacta significativamente a biodiversidade aquática, influenciando a estrutura e a composição das comunidades de peixes e alterando os ecossistemas de água doce. Neste estudo, investigamos como o uso da terra e outras variáveis ambientais influenciam a estrutura e a composição da ictiofauna na **Bacia do Rio Mundaú, localizada no Centro de Endemismo Pernambuco (CEP)**, utilizando a abordagem de eDNA metabarcoding. Amostras de água foram coletadas em riachos de cabeceira distribuídos entre quatro categorias de uso do solo (Floresta, Lavoura, Pecuária e Urbano) e analisadas por meio da amplificação da região 12S do DNA mitocondrial com primers MiFish-U. O sequenciamento gerou 3.468.152 reads brutos, que, após o processamento bioinformático e a filtragem de qualidade, resultaram em uma matriz final com 32.940 reads e 39 MOTUs atribuídas a 36 espécies nominais ou táxons, pertencentes a 6 ordens de peixes. Dentre essas, 2 táxons, correspondentes as espécies *Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli*, foram classificados como exóticos. A curva de acumulação de espécies mostrou uma redução da taxa de descoberta nas últimas amostras, sugerindo que o esforço amostral foi suficiente para capturar grande parte da diversidade local. A riqueza de espécies variou entre os pontos amostrais, com um mínimo de 2 espécies e um máximo de 17 espécies. O índice de Shannon-Wiener (H') variou de 0,076 a 2,099, com valores mais altos em áreas de Floresta, Lavoura e Pecuária, enquanto os pontos urbanos apresentaram maior variação e menores valores médios de diversidade. O teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças significativas na diversidade de Shannon-Wiener ($\chi^2 = 9,3224$; $p = 0,0253$) entre os tipos de uso do solo. O teste post-hoc de Mann-Whitney, com correção de Benjamini-Hochberg, revelou que a única comparação estatisticamente significativa foi entre as áreas de Lavoura e Urbana (p ajustado = 0,049), enquanto a comparação entre Floresta e Urbana perdeu significância após o ajuste ($p = 0,031$; p ajustado = 0,061). A análise PERMANOVA indicou que o uso do solo explica 17,2% da variação na composição ictiofaunística ($F = 1,38$; $p = 0,096$), representando uma evidência moderada de influência antrópica, embora sem segregação completa entre os ambientes, conforme indicado pela sobreposição no NMDS. As comparações pareadas revelaram que a diferença mais pronunciada ocorreu entre os ambientes Floresta e Urbano ($p = 0,071$; p ajustado BH = 0,297), seguidos pela diferença entre Lavoura e Urbano ($p = 0,099$; p ajustado BH = 0,297). A análise de Valor Indicador (IndVal) identificou *Callichthys callichthys* e *Poecilia sp.1* como espécies indicadoras de áreas de pecuária, enquanto *Oreochromis niloticus* apresentou forte associação com ambientes urbanos. Não foram detectadas espécies indicadoras para ambientes

de Floresta e Lavoura, possivelmente devido à predominância de espécies generalistas e à presença da espécie invasora *Coptodon rendalli* em ambos os ambientes. A análise SIMPER revelou que a dissimilaridade entre os ambientes foi impulsionada principalmente por *Coptodon rendalli*, *Oreochromis niloticus*, *Poecilia sp.1* e *Hoplias sp.2*. A Análise de Componentes Principais (PCA) identificou dois eixos principais que explicaram 45,22% da variância total dos dados ambientais e paisagísticos. O PC1 (25,64%) refletiu variações associadas a características hidrológicas locais, enquanto o PC2 (19,58%) representou gradientes de uso do solo. Entre as variáveis ambientais mais relevantes, destacaram-se a Profundidade Média (PC1: -0.391), a porcentagem de área de drenagem ocupada por Pecuária (PC1: -0.386) e a cobertura florestal no buffer ripário (PC2: 0.502). A Análise de Redundância (RDA) demonstrou que a proporção de área urbana na drenagem ($F = 3,82$; $p = 0,002$) foi a variável mais preditiva da estrutura da comunidade de peixes, seguida pela presença de serrapilheira no substrato ($F = 2,51$; $p = 0,023$). Juntas, essas variáveis explicaram 23,16% da variação total na composição das MOTUs. Isso sugere que a urbanização exerce o maior impacto na estrutura ictiofaunística da bacia, enquanto a presença de substratos estruturados, como serrapilheira, pode atuar como um fator secundário na manutenção da diversidade. Os resultados deste estudo evidenciam que a heterogeneidade ambiental do riverscape, combinada ao uso do solo, desempenha um papel crucial na determinação dos padrões de diversidade e na estrutura das comunidades de peixes. Além disso, reforçam o potencial do eDNA metabarcoding como uma ferramenta sensível e eficaz para o monitoramento ecológico, especialmente em regiões megadiversas e com déficit de inventários como a MNCE. Esses achados fornecem subsídios valiosos para ações de conservação e manejo, destacando a necessidade de controlar os efeitos da urbanização e da introdução de espécies exóticas, além de fortalecer os bancos de dados genéticos regionais para aprimorar futuras aplicações do eDNA na gestão dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: análises multivariadas, *riverscape*, uso do solo, eDNA metabarcoding, ecologia, peixes, neotrópico

ABSTRACT

Anthropic land use significantly impacts aquatic biodiversity by influencing the structure and composition of fish communities and altering freshwater ecosystems. In this study, we investigated how land use and other environmental variables influence the structure and composition of fish communities in the Mundaú River Basin, located in the Pernambuco Endemism Center (PEC), using the eDNA metabarcoding approach. Water samples were collected from headwater streams distributed across four land use categories (Forest, Agriculture, Pasture, and Urban) and analyzed through amplification of the mitochondrial 12S region using MiFish-U primers. Sequencing generated 3,468,152 raw reads, which, after bioinformatic processing and quality filtering, resulted in a final dataset with 32,940 reads and 39 MOTUs assigned to 36 nominal species or taxa belonging to six fish orders. Among these, two taxa, *Oreochromis niloticus* and *Coptodon rendalli*, were classified as exotic species. The species accumulation curve showed a reduction in the discovery rate in the final samples, suggesting that the sampling effort was sufficient to capture most of the local diversity. Species richness ranged from 2 to 17 species per sampling point. The Shannon-Wiener diversity index (H') varied from 0.076 to 2.099, with higher values in Forest, Agriculture, and Pasture areas, while urban points exhibited greater variability and lower mean diversity values. The Kruskal-Wallis test indicated significant differences in Shannon-Wiener diversity ($\chi^2 = 9.3224$; $p = 0.0253$) among land use types. The post-hoc Mann-Whitney test with Benjamini-Hochberg correction revealed that the only statistically significant difference was between Agriculture and Urban areas (adjusted $p = 0.049$), while the comparison between Forest and Urban lost significance after adjustment ($p = 0.031$; adjusted $p = 0.061$). PERMANOVA analysis indicated that land use explains 17.2% of the variation in fish community composition ($F = 1.38$; $p = 0.096$), representing moderate evidence of anthropogenic influence, although without complete segregation between environments, as shown by the NMDS overlap. Pairwise comparisons revealed that the most pronounced differences occurred between Forest and Urban ($p = 0.071$; adjusted $p = 0.297$) and between Agriculture and Urban ($p = 0.099$; adjusted $p = 0.297$). The Indicator Species Analysis (IndVal) identified *Callichthys callichthys* and *Poecilia* sp.1 as indicators of pasture areas, while *Oreochromis niloticus* showed a strong association with urban environments. No indicator species were detected for Forest or Agriculture areas, likely due to the predominance of generalist species and the presence of the invasive species *Coptodon rendalli* in both environments. The SIMPER analysis revealed that dissimilarity between environments was mainly driven by *Coptodon rendalli*, *Oreochromis niloticus*, *Poecilia*

sp.1, and *Hoplias sp.2*. Principal Component Analysis (PCA) identified two main axes that explained 45.22% of the total variance in environmental and landscape data. PC1 (25.64%) reflected variation associated with local hydrological characteristics, while PC2 (19.58%) represented gradients of land use. The most relevant environmental variables included Mean Depth (PC1: -0.391), the percentage of pasture land in the drainage area (PC1: -0.386), and forest cover in the riparian buffer (PC2: 0.502). Redundancy Analysis (RDA) showed that the proportion of urban area in the drainage (F = 3.82; p = 0.002) was the most predictive variable of fish community structure, followed by the presence of leaf litter in the substrate (F = 2.51; p = 0.023). Together, these variables explained 23.16% of the total variation in MOTU composition. This suggests that urbanization has the greatest impact on fish community structure in the basin, while the presence of structured substrates like leaf litter plays a secondary role in maintaining biodiversity. The results of this study demonstrate that riverscape heterogeneity combined with land use plays a crucial role in determining diversity patterns and structuring fish communities. Furthermore, the findings reinforce the potential of eDNA metabarcoding as a sensitive and effective tool for ecological monitoring, especially in megadiverse regions with a lack of taxonomic inventories such as the MNCE. These findings provide valuable insights for conservation and management strategies, highlighting the need to mitigate the effects of urbanization and invasive species introductions, as well as the importance of strengthening regional genetic reference databases to improve future eDNA-based applications in aquatic ecosystem management.

Keywords: multivariate analyses, riverscape, land use, eDNA metabarcoding, ecology, fish, neotropics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação gráfica das hipóteses testadas neste estudo.....	7
Figura 2 - Localização da bacia hidrográfica do Rio Mundaú	42
Figura 3 - Cobertura e uso do solo na bacia hidrográfica do Rio Mundaú. ...	43
Figura 4 - Mapa da rede hídrica da bacia do rio Mundaú, Estados de Pernambuco e Alagoas.....	45
Figura 5 - Mapa da rede hídrica da bacia do rio Mundaú, Estados de Pernambuco e Alagoas, e cobertura e uso de solo, incluindo pontos de amostragem.	48
Figura 6 - Relação entre Número de Reads e Diversidade de Espécies/Táxons nominais nas Classes Identificadas	63
Figura 7 - Distribuição taxonômica das espécies nominais e táxons por Ordem (A) e Família (B).....	67
Figura 8 - Curva de Acumulação de Espécies nominais gerada pelo Método de Permutação Aleatória (1000 permutações).	68
Figura 9 - Comparação dos Índices de Diversidade Alfa	70
Figura 10 - Distribuição do Índice de Shannon-H por Uso do Solo	71
Figura 11 - Comparação dos Índices de Pielou e Simpson por Tipo de Uso de Solo	71
Figura 12 - NMDS representando a variação na composição da comunidade de peixes entre os diferentes usos do solo.	73
Figura 13 - Representação Gráfica da Homogeneidade da Dispersão Beta por Tipo de Uso do Solo	75
Figura 14 - Análise de Componentes Principais (PCA)	80
Figura 15 - Diagrama de ordenação da análise de redundância (RDA).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localidades dos pontos de amostragem na bacia do rio Mundaú	47
Tabela 2 - Sequências dos primers MiFish-U utilizados na amplificação do DNA	53
Tabela 3 - Número de Reads, MOTUs e Diversidade Taxonômica nos Grupos Identificados.....	62
Tabela 4 - Distribuição de MOTUs e Reads de Peixes de Água Doce e Marinhos por Critério de Similaridade	64
Tabela 5 - Lista de táxons identificados por eDNA metabarcoding na Bacia do Rio Mundaú	65
Tabela 6 - Diversidade Alfa por Ponto de Amostragem	69
Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis	72
Tabela 8 - Teste Post-Hoc de Mann-Whitney com Correção de Benjamini-Hochberg (BH).....	72
Tabela 9 - Resultados da PERMANOVA baseada no índice de Bray-Curtis.	74
Tabela 10 - Comparação pareada da composição da comunidade (PERMANOVA).	74
Tabela 11 - Teste de Permutação para Homogeneidade da Dispersão Beta (Betadisper).....	75
Tabela 12 - Resultados da Análise de Valor Indicador (IndVal) para os Diferentes Usos do Solo.	76
Tabela 13 - Resultados da Análise SIMPER para a Dissimilaridade entre os Usos do Solo.	77
Tabela 14 - Importância dos Componentes Principais.....	78
Tabela 15 - Cargas das Variáveis nos Primeiros Componentes da PCA.....	79
Tabela 16 - Significância global do modelo	81
Tabela 17 - Contribuição Individual das Variáveis	81
Tabela 18 - Variância Explicada e Significância dos Eixos da RDA.....	81
Tabela 19 - Cargas das Variáveis Ambientais nos Eixos da RDA.....	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	5
3	HIPÓTESES	6
4	REVISÃO DE LITERATURA	8
4.1	O conceito de Riverscape e sua aplicação na ecologia de peixes e ecossistemas fluviais	8
4.2	Aplicações do eDNA metabarcoding para o estudo da estrutura da ictiofauna	15
4.3	Padronização de protocolos para coleta e análise de edna em ambientes aquáticos	27
4.4	Casos de estudo: Aplicações do eDNA metabarcoding na avaliação da ictiofauna	29
4.5	Síntese dos métodos utilizados nos estudos de eDNA metabarcoding..	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1	Área de estudo	42
5.2	Seleção dos pontos de amostragem.....	44
5.3	Protocolo de coleta de eDNA.....	50
5.4	Extração e purificação do eDNA.....	52
5.5	PCR e sequenciamento de eDNA.....	52
5.6	Processamento de sequências e atribuição taxonômica.....	53
5.7	Análise estatística.....	56
6	RESULTADOS	62
6.1	Resultados do sequenciamento e processamento de dados	62
6.2	Curva de acumulação de espécies	68
6.3	Diversidade alfa nos pontos de amostragem	69
6.4	Comparação entre áreas com diferentes tipos de uso da terra	72
6.5	Diversidade beta e estrutura da comunidade.....	73
6.6	Padrões de associação entre a comunidade e o uso do solo	76
6.7	Influência das variáveis ambientais na estrutura da comunidade.....	78
7	DISCUSSÃO	84
7.1	Resultados do sequenciamento e processamento de dados	84
7.2	Diversidade alfa nos pontos de amostragem	92
7.3	Influência do uso do solo na estrutura da comunidade de peixes	94
7.4	Análise de espécies indicadoras e contribuição das espécies nominais para a dissimilaridade entre ambientes.....	95
7.5	Influência das variáveis ambientais na estrutura da comunidade.....	97
7.6	Implicações para a conservação, limitações e direções futuras	99
8	CONCLUSÕES	101
9	REFERENCIAS	103
10	APÊNDICES	113

1 INTRODUÇÃO

De uma perspectiva ecológica, o termo “*riverscape*” refere-se a uma visão ampla de um córrego ou rio e sua bacia hidrográfica, incluindo atributos e interações naturais e culturais (Hauer; Lamberti, 2017). A biota dos rios está intimamente ligada às características de seu ambiente, com muitas espécies se distribuindo de acordo com gradientes longitudinais (nascente-delta), laterais (terrestres-aquáticos), verticais (superfície-fundo) e temporais (sazonalidade e mudanças em períodos mais longos) que caracterizam o *riverscape*. Por isso, alterações na paisagem terrestre, como a construção de uma barragem ou o desmatamento de uma mata ciliar, podem influenciar a biota aquática de maneira direta ou indireta (Hauer; Lamberti, 2017; Torgersen et al., 2022; Wright; Flecker, 2004; Zambaldi; Pompeu, 2020).

Nos Neotrópicos, poucos estudos aplicam o conceito de paisagem fluvial para avaliar o impacto das atividades humanas na estrutura e composição da comunidade de peixes (Wright; Flecker, 2004). Tanto no nível de bacia hidrográfica como nas escalas ribeirinhas, a substituição da vegetação nativa pela agricultura afeta a composição taxonômica e funcional das comunidades de peixes (Dala-Corte et al., 2016). O desmatamento contribui para o aumento da sedimentação e a redução da entrada de detritos lenhosos, levando à simplificação dos habitats e à alteração da hidrologia e da química da água. Como resultado, há uma mudança na composição das espécies de peixes e na abundância das guildas tróficas. Por exemplo, as populações de espécies de peixes especializadas tendem a declinar ou a extinguir-se, enquanto as espécies generalistas tendem a aumentar em abundância (Dala-Corte et al., 2016; Montag et al., 2019). A compreensão dessas relações no contexto do *riverscape* é essencial para a gestão sustentável dos recursos hídricos, a conservação da biota aquática e o desenvolvimento de estratégias eficazes para a preservação dos habitats fluviais (Dala-Corte et al., 2016; Leitão et al., 2018).

Considerando os desafios mencionados, a análise de DNA ambiental (eDNA) em amostras de águas superficiais surge como uma ferramenta promissora para o registro da ictiofauna em uma escala local e relativamente recente. O eDNA refere-se ao material genético que os organismos liberam no ambiente. Este material pode provir de várias fontes: secreções corporais, desprendimento de células epiteliais, decomposição, etc. sendo encontrado ligado a partículas em suspensão ou em

sedimentos (Cantera et al., 2022; Cristescu; Hebert, 2018; Kelly et al., 2014; Miya et al., 2015).

Estudos pioneiros que detectam eDNA de peixes para identificação de espécies tiveram início em 2010. Desde então, sua aplicação tem sido testada em diversos ambientes aquáticos, como lagoas, rios e oceanos. (Cristescu; Hebert, 2018; Miya et al., 2015; Miya; Gotoh; Sado, 2020; Rourke et al., 2022). Além disso, essa técnica se destaca como uma alternativa não invasiva, oferecendo menores custos operacionais e logísticos em comparação aos métodos tradicionais de captura, o que a torna uma solução viável para estudos de monitoramento ambiental em larga escala (Carim et al., 2016b; Carvalho et al., 2022; Miya et al., 2015; Xu et al., 2023).

No entanto, a aplicação do eDNA no Brasil ainda enfrenta desafios, como a padronização de protocolos, limitações na capacidade de detecção em rios com alta diversidade de espécies e a necessidade de bases de dados de referência mais abrangentes (Dal Pont et al., 2021; Deiner et al., 2017; Miya et al., 2015; Miya; Gotoh; Sado, 2020; Sales et al., 2021).

Inserida na ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE), que compreende os sistemas hidrográficos localizados entre as bacias dos rios São Francisco e Parnaíba, a bacia do rio Mundaú faz parte de um contexto hidrográfico caracterizado por redes de drenagem predominantemente intermitentes, moldadas por fatores como o clima semiárido, solos cristalinos impermeáveis e forte sazonalidade hidrológica (Berbel-Filho et al., 2018; Rosa et al., 2003). Historicamente considerada uma região de baixa diversidade, estudos recentes demonstram que a MNCE abriga uma ictiofauna mais rica do que se supunha, composta tanto por espécies endêmicas quanto por táxons compartilhados com ecorregiões adjacentes, como o Maranhão-Piauí, o rio São Francisco e a Mata Atlântica Nordeste (Albert; Reis, 2011; Berbel-Filho et al., 2018; Rosa et al., 2003). Esse pano de fundo biogeográfico é fundamental para compreender os padrões de diversidade detectados, bem como as potenciais limitações impostas pela ausência de inventários sistemáticos na região.

A bacia do rio Mundaú, localizada entre os estados de Alagoas (AL) e Pernambuco (PE), engloba um dos mais importantes sistemas estuarinos da costa nordeste brasileira, o Complexo Estuário-Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM), onde são

desenvolvidas atividades econômicas como cultivo de cana-de-açúcar, pesca e turismo (Marques; Sazima; Campinas, 1991; Santos; Sampaio, 2013). Esta área possui inúmeros estudos sobre sua alarmante deterioração ambiental, causada por processos de eutrofização, contaminação por efluentes industriais e domésticos, ocupação de áreas marginais, destruição de habitats e diminuição da biodiversidade (Barros et al., 2019; Dos Santos et al., 2021; Maioli et al., 2010; Medeiros et al., 2020; Melo-Magalhães et al., 2009).

Em contraste, as informações disponíveis sobre a parte superior da bacia são muito limitadas. Cavalcanti (2013), realizou uma avaliação ambiental das nascentes do rio Mundaú para determinar seu estado de conservação e identificar os impactos ambientais causados pela atividade antrópica. O autor constatou que a falta de planejamento adequado e a ocupação desordenada do entorno das nascentes geram uma grave deterioração da qualidade da água, relatando altos índices de bactérias coliformes. Em relação aos peixes, não há trabalhos publicados que abordem sua diversidade ou o impacto da expansão das atividades humanas na dinâmica dessa comunidade.

É muito importante gerar informações que permitam compreender os efeitos da alteração da paisagem fluvial na estrutura e composição da comunidade de peixes da bacia do rio Mundaú. Assim, esses resultados podem ser utilizados como subsídios em programas de conscientização ambiental e apoiar a tomada de decisões, visando a melhoria da qualidade de vida para a população e condições favoráveis ao meio ambiente.

Neste trabalho, exploramos a comunidade de peixes por meio da coleta de amostras de água utilizando a abordagem do eDNA metabarcoding. Esse método permite analisar a diversidade e estrutura da comunidade, considerando as variações espaciais relacionadas ao uso da terra em um sistema fluvial com características de uso da terra espacialmente distintas. Este estudo será pioneiro na aplicação do eDNA como ferramenta para avaliar o impacto da atividade humana, sob o enfoque da paisagem fluvial, na estrutura e composição da comunidade de peixes no nordeste do Brasil.

Assim, busca-se responder à seguinte questão: como as características da paisagem fluvial, definidas conforme o tipo predominante de uso do solo em seu entorno, influenciam a estrutura e a composição da comunidade de peixes na Mata Atlântica do Nordeste do Brasil? A compreensão desses fatores permitirá subsidiar estratégias eficazes de gestão ambiental e conservação da biodiversidade.

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Objetivo geral

- Avaliar como o uso antrópico da terra e as conseqüentes alterações nas características da paisagem fluvial influenciam a estrutura e a composição da comunidade de peixes da Bacia do Rio Mundaú (AL-PE), utilizando a abordagem de metabarcoding de eDNA.

Objetivos específicos:

- Caracterizar o uso e a cobertura do solo, os atributos físicos dos riachos e as métricas da paisagem fluvial nos locais de amostragem, com base em análises espaciais e variáveis ambientais locais.
- Caracterizar a estrutura e composição da comunidade de peixes nos pontos de amostragem a partir do metabarcoding de eDNA.
- Comparar a estrutura e composição da ictiofauna entre diferentes tipos de uso do solo (floresta, lavoura, pecuária e urbana), com base em padrões de diversidade.
- Identificar os principais táxons associados a cada tipo de uso da terra, considerando sua frequência e exclusividade em diferentes categorias de ambiente.
- Investigar como variáveis ambientais locais e paisagísticas influenciam a composição da comunidade de peixes nos diferentes locais de amostragem.
- Contribuir para o conhecimento da biodiversidade de peixes da Bacia do Rio Mundaú, gerando subsídios para conservação e manejo ambiental.

3 HIPÓTESES

As hipóteses deste estudo foram formuladas com base na expectativa de que o uso antrópico da terra e as alterações na paisagem fluvial influenciam negativamente a estrutura e a composição da comunidade de peixes. A Figura 1 apresenta uma representação gráfica dessas hipóteses, contrastando os cenários esperados caso a hipótese nula (H_0) ou a hipótese alternativa (H_1) sejam verdadeiros.

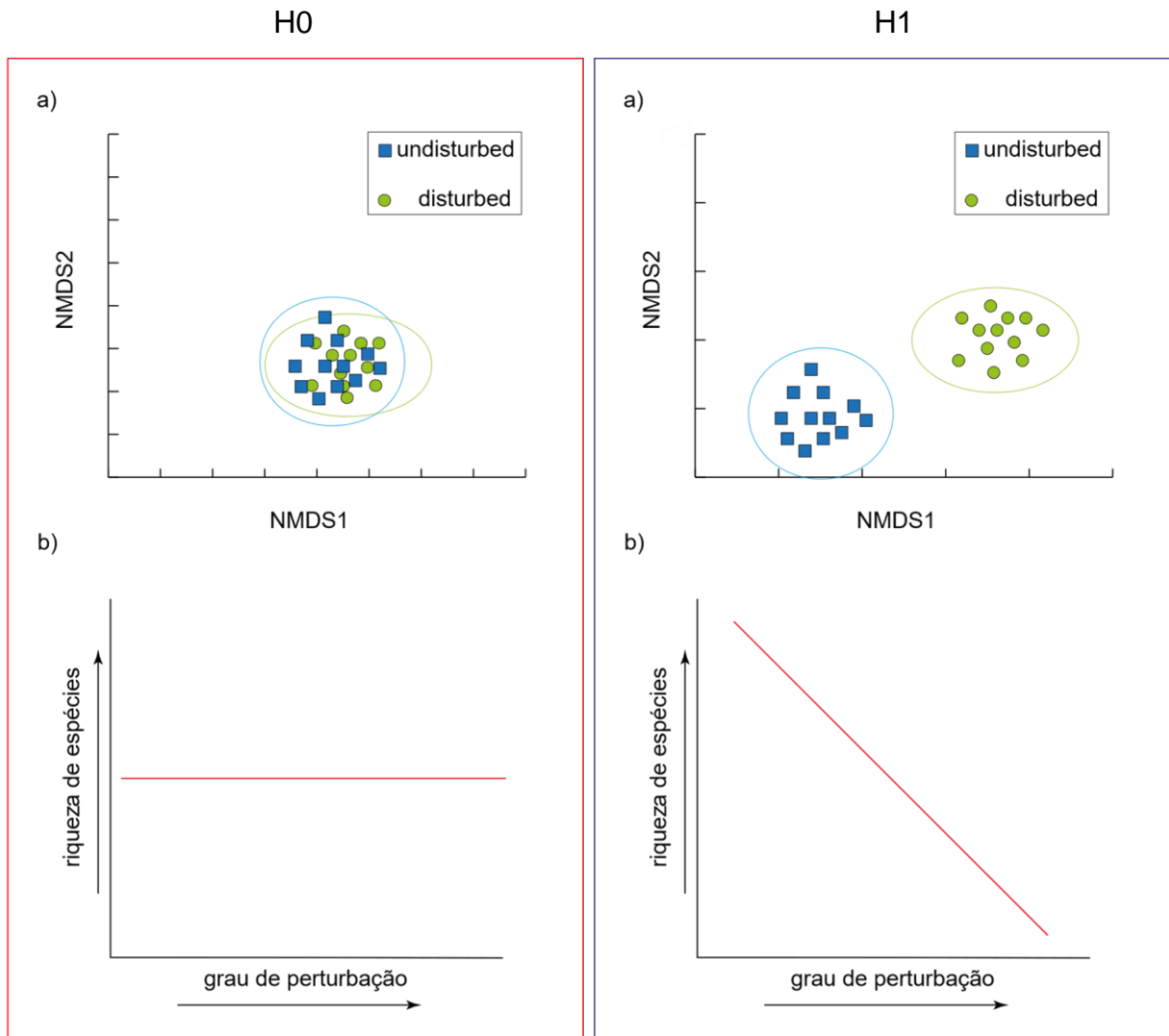
Hipótese nula (H_0):

O uso humano intensivo da terra e seu consequente impacto na qualidade da água, habitats aquáticos e nas características da paisagem fluvial não gera uma diferença significativa na estrutura e composição da comunidade de peixes entre os locais impactados e as áreas protegidas que ainda conservam sua vegetação ciliar, tampouco afeta os padrões de diversidade observados.

Hipótese alternativa (H_1):

O uso humano intensivo da terra e seu consequente impacto na qualidade da água, habitats aquáticos e nas características da paisagem fluvial gera uma diferença significativa na estrutura e composição da comunidade de peixes entre os locais impactados e as áreas protegidas, resultando em alterações nos padrões de diversidade e possível desaparecimento ou substituição de espécies associadas a habitats conservados.

Figura 1 - Representação gráfica das hipóteses testadas neste estudo.



A figura “a)” (H₀, esquerda) mostra, em um gráfico NMDS, o cenário correspondente à hipótese nula, em que não se espera encontrar diferenças significativas na composição e estrutura da comunidade de peixes entre os pontos de amostragem, independentemente do tipo de uso do solo. Nesse caso, os grupos de áreas perturbadas e não perturbadas apresentariam comunidades sobrepostas e sem distinção clara. A figura “b)” (H₀, esquerda) representa a expectativa de que a riqueza de espécies permaneça constante, sugerindo que as alterações na paisagem fluvial não exercem influência significativa sobre a diversidade de peixes.

As figuras “a)” e “b)” à direita (H₁) representam a hipótese alternativa deste estudo. A figura “a)” mostra a expectativa de que os grupos de áreas perturbadas e não perturbadas apresentem comunidades estruturalmente distintas no espaço NMDS, com maior similaridade interna dentro de cada grupo. A figura “b)” ilustra a expectativa de que as áreas perturbadas apresentem menor diversidade de peixes em comparação com as áreas conservadas, em razão da remoção da cobertura florestal (em escala de captação) e da vegetação ciliar (em escala local), o que favorece a entrada de sedimentos e nutrientes no canal do rio, intensifica os processos de erosão e desencadeia a homogeneização dos habitats, resultando na consequente perda de biodiversidade (Tibúrcio et al., 2016).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O CONCEITO DE RIVERSCAPE E SUA APLICAÇÃO NA ECOLOGIA DE PEIXES E ECOSSISTEMAS FLUVIAIS

4.1.1 Fundamentos do Conceito de Riverscape

O conceito de "*riverscape*" refere-se a uma abordagem integrada da paisagem fluvial, considerando a interação entre processos ecológicos e antrópicos em diferentes escalas espaciais e temporais que influenciam a biota aquática. A paisagem fluvial em qualquer ponto dentro da rede de drenagem é considerada em quatro dimensões, composta por caminhos hidrológicos complexos acima e abaixo do solo, que se expandem e se contraem de acordo com a vazão do rio (Hauer; Lamberti, 2017).

A primeira dimensão, longitudinal, refere-se ao continuum fluvial que se estende das nascentes até o oceano, representando o fluxo de montante para jusante. A segunda dimensão, lateral, abrange a zona de transição entre o canal do rio e o ambiente terrestre adjacente, incluindo as planícies de inundação que são periodicamente alagadas durante cheias. Essas dimensões destacam a conectividade do rio com a paisagem ao seu redor, influenciando a ecologia e a dinâmica dos ecossistemas aquáticos. A terceira dimensão, vertical, envolve as trocas entre a superfície e o subsolo do canal do rio e suas planícies de inundação, permitindo o movimento de água, materiais, nutrientes e organismos essenciais para a funcionalidade do ecossistema. Por fim, a quarta dimensão, temporal, refere-se às mudanças ao longo do tempo, em que eventos como inundações e secas modificam a hidrologia, o transporte de sedimentos e a distribuição da vegetação e de outros organismos. Essas interações dinâmicas influenciam a estrutura e a função dos ecossistemas fluviais, destacando a complexidade e a conectividade do sistema (Hauer; Lamberti, 2017).

A biota nos sistemas fluviais é distribuída em função dos gradientes biofísicos que refletem a natureza quadridimensional da rede fluvial. Muitas espécies apresentam preferências distintas por condições ambientais específicas, que são ideais apenas em determinadas localidades ao longo dos gradientes longitudinais (montante- jusante), laterais (aquático-terrestre), verticais (superfície-subsolo) e temporais

(mudanças ao longo do tempo) que caracterizam a paisagem fluvial. Esses gradientes influenciam diretamente a distribuição, a abundância e a dinâmica das comunidades aquáticas (Hauer; Lamberti, 2017).

Como as condições ambientais em qualquer ponto de um rio são continuamente influenciadas pelas condições em pontos a montante, os fatores biofísicos que influenciam a distribuição e a abundância da biota fluvial devem ser analisados no contexto da rede fluvial e de sua paisagem circundante (Hynes, 1975). Conforme ressaltado por Fausch et al. (2002), "uma visão contínua do rio é necessária para entender como os processos que interagem entre escalas estabelecem o contexto para os peixes de riachos e seu habitat." Além disso, os riachos são sistemas lineares nos quais habitats únicos ou eventos de perturbação em locais específicos podem ter efeitos profundos que influenciam as propriedades de todo o sistema, a grandes distâncias em ambas as direções (Fausch et al., 2002).

Por outro lado, as populações e comunidades de peixes de riachos geralmente realizam aspectos importantes de seus ciclos de vida em escalas espaciais intermediárias, aproximadamente entre 1 e 100 km de segmentos do rio, respondendo a mudanças no habitat que ocorrem em escalas temporais de 5 a 50 anos (Mantua et al., 1997; Reeves et al., 1995). O principal desafio é que essas escalas intermediárias são as mais difíceis para os biólogos compreenderem ou amostrarem. Por exemplo, a partir da margem de um rio, geralmente é possível observar menos de 100 metros do habitat contínuo, muitas vezes representando apenas uma fração do necessário para os ciclos de vida dos peixes (Fausch et al., 2002).

4.1.2 Influência do Uso da Terra na Estrutura dos Ecossistemas Fluviais

A abordagem do *riverscape* permite uma compreensão integrada dos processos ecológicos e antrópicos que influenciam a estrutura das comunidades de peixes em múltiplas escalas espaciais e temporais. A estrutura do habitat, os gradientes ambientais e a fragmentação dos cursos d'água são elementos-chave na determinação da biodiversidade aquática, tornando essencial a aplicação do conceito de *riverscape* para avaliar os impactos cumulativos da ação humana e orientar estratégias de manejo e conservação dos ecossistemas fluviais (Dala-Corte et al., 2019; Hauer; Lamberti, 2017; Leitão et al., 2018; Torgersen et al., 2022; Zambaldi; Pompeu, 2020).

Estudos como os de Torgersen et al. (2022) e Leitão et al. (2018) demonstram que a conectividade ecológica e a fragmentação da paisagem fluvial afetam diretamente a distribuição e a composição da ictiofauna. Além disso, pesquisas como as de Dala-Corte et al. (2019) e Seabra et al. (2022) indicam que a modificação do uso do solo, incluindo o desmatamento e a conversão para áreas agrícolas, pode reduzir a diversidade funcional e promover a homogeneização das comunidades aquáticas.

A substituição da vegetação ripária por atividades agrícolas e urbanas tem sido apontada como um dos principais fatores que afetam negativamente a biodiversidade de peixes, contribuindo para a simplificação dos habitats, o aumento da sedimentação e as alterações na qualidade da água. Essas mudanças resultam na homogeneização dos habitats e na substituição de espécies especializadas por espécies generalistas (Dala-Corte et al., 2016; Li et al., 2023; Montag et al., 2019). Um exemplo emblemático desse fenômeno foi documentado no rio Las Marias (Venezuela), onde o desmatamento da paisagem fluvial em uma escala longitudinal de menos de 5 km levou à redução da diversidade absoluta e funcional de peixes. A remoção de detritos lenhosos (troncos, raízes, serapilheira e galhos) eliminou recursos alimentares, refúgios contra predadores e proteção contra correntes para diversas espécies, com implicações críticas para a conservação, o funcionamento ecossistêmico e a economia local (Wright; Flecker, 2004). Esses achados reforçam que a vegetação ripária não apenas mitiga impactos locais, como também sustenta processos ecológicos essenciais para a biota aquática.

Além disso, intervenções antrópicas, como a fragmentação de rios por barragens, urbanização e expansão agrícola resultam em alterações significativas na estrutura da comunidade de peixes. A perda de conectividade longitudinal e a interrupção dos ciclos naturais de fluxo impactam negativamente a dispersão das espécies, restringindo o acesso a áreas essenciais para alimentação e desova, o que reduz a diversidade funcional e a resiliência ecológica dos ecossistemas aquáticos (Leitão et al., 2018; Wright; Flecker, 2004; Zambaldi; Pompeu, 2020). A abordagem do *riverscape* possibilita uma compreensão ampla desses impactos, permitindo a identificação de padrões de distribuição de espécies ao longo do gradiente fluvial e a análise das interações entre a estrutura da paisagem e a biodiversidade aquática (Torgersen et al., 2022).

A influência do uso da terra sobre os ecossistemas fluviais é frequentemente avaliada utilizando buffers espaciais que consideram distâncias ribeirinhas e a área de drenagem contribuinte (Dala-Corte et al., 2016; Frimpong et al., 2005; Seabra; Benone; Montag, 2022). Frimpong et al. (Frimpong et al., 2005) investigaram a eficácia de diferentes larguras de buffers laterais e longitudinais na correlação entre características do uso do solo e variáveis ecológicas de habitats aquáticos. Para isso, analisaram a associação entre o percentual de vegetação natural (denominada floresta ripária ou buffer) e as características das assembleias de peixes em 107 localidades de riachos em Indiana, USA. Os autores concluíram que a largura ideal de buffers ripários para capturar informações ecológicas significativas é de 30 metros laterais e 600 metros longitudinais. Buffers mais estreitos capturam informações insuficientes, enquanto buffers mais largos podem incluir dados irrelevantes, enfraquecendo as correlações ou aumentando a probabilidade de erro.

Dala-Corte et al. (Dala-Corte et al., 2016) analisaram os efeitos da agricultura, em múltiplas escalas espaciais (local, ripária e de bacia), sobre a biodiversidade de peixes em 54 riachos vadeáveis nos campos do sul do Brasil, abrangendo as bacias dos rios Uruguai e Lagoa dos Patos. Os riachos incluíam cursos d'água de segunda, terceira e quarta ordem (classificação de Strahler, 1957), inseridos em uma paisagem fortemente dominada por atividades agrícolas. Foram utilizados buffers ripários de 50 metros de largura em ambas as margens e 1 km de extensão longitudinal para estimar a influência da vegetação ripária. Esses trechos de mata ciliar foram essenciais para mitigar os efeitos da agricultura, promovendo a entrada de matéria orgânica particulada (CPOM), controlando a proliferação de macrófitas aquáticas e contribuindo para a manutenção da heterogeneidade do habitat. O estudo também destacou que os efeitos da agricultura sobre as comunidades de peixes são dependentes da escala espacial. No entanto, esses efeitos nem sempre impactam negativamente a riqueza de espécies, pois, em determinados contextos, podem favorecer a entrada de espécies mais adaptadas a condições ambientais alteradas pela remoção da vegetação ripária e pelo uso agrícola da bacia, como maior produtividade primária e proliferação de macrófitas aquáticas. Por outro lado, à medida que as margens dos riachos se tornam mais impactadas pela agricultura, espécies pertencentes às guildas bentônicas e litófilas, funcionalmente diversificadas e associadas a substratos estruturados, tendem a ser substituídas por membros da guilda nectônica,

caracterizados por maior redundância funcional e adaptados a habitats simplificados, ricos em macrófitas. Esse padrão explica a redução na diversidade funcional, mesmo em contextos onde há aumento na riqueza taxonômica em riachos impactados pela agricultura em escala local. Esses achados reforçam a importância de considerar múltiplas escalas espaciais na avaliação dos impactos antrópicos, bem como de conservar a vegetação ripária, por meio de buffers contínuos de 50 metros de largura e 1 km de extensão, como estratégia eficaz para mitigar os efeitos negativos da agricultura sobre a biodiversidade aquática em riachos tropicais, recomendando-se a priorização dessas áreas nas políticas públicas de conservação ambiental.

Seabra et al. (2022) conduziram um estudo detalhado na bacia do rio Capim, localizada na Amazônia oriental, Brasil, para avaliar os impactos de diferentes usos do solo sobre a diversidade beta funcional de peixes em riachos. Foram analisados 32 riachos de primeira a terceira ordem, utilizando buffers ripários de 60 metros de largura e 600 metros de extensão longitudinal. A escolha dessa abordagem foi fundamentada no estudo de Frimpong et al. (2005), que recomendou buffers longitudinais de 600 m e laterais de 30 m, além de atender à legislação ambiental brasileira (Lei Federal nº 12.651/2012), que exige a preservação permanente de 30 metros de vegetação natural em ambas as margens de cursos d'água amazônicos com largura de até 10 metros. Esses buffers foram delineados com base em imagens de satélite RapidEye, com resolução espacial de 5 metros, permitindo a classificação de cinco tipos de uso do solo: floresta, vegetação secundária, pastagens, solo exposto e outros. Os resultados revelaram que as variáveis da paisagem, como a porcentagem de floresta, floresta secundária e pecuária, assim como variáveis locais nos riachos, incluindo padrões de fluxo de água, morfologia do canal e tipo de substrato, influenciaram tanto a diversidade beta funcional quanto a substituição funcional das comunidades de peixes. Os autores destacam a necessidade de preservar zonas ripárias e implementar políticas públicas que integrem a conservação da vegetação nativa como medida essencial para mitigar os impactos das atividades humanas sobre os ecossistemas aquáticos amazônicos.

4.1.3 Contexto Biogeográfico da Bacia do Rio Mundaú e Padrões de Distribuição em Ecorregiões Neotropicais

A bacia do rio Mundaú, localizada entre os estados de Alagoas (AL) e Pernambuco (PE), drenando em direção ao oceano Atlântico, está inserida na Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Oriental, que engloba uma série de pequenas e médias bacias costeiras situadas entre as bacias dos rios São Francisco e Parnaíba. A bacia do rio Mundaú, juntamente com outros sistemas hidrográficos adjacentes, como os rios Una, Paraíba e Meirim, integra a **ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE)**, (Berbel-Filho et al., 2018; Gomes et al., 2016; Rosa et al., 2003). A história hidrográfica da MNCE está profundamente ligada às dinâmicas do escudo cristalino brasileiro, onde fatores como a expansão do clima semiárido, a natureza impermeável dos solos e a topografia da região moldaram redes hidrográficas caracterizadas por regimes intermitentes, sazonalidade extrema e uma forte dependência de brejos de altitude e cabeceiras serranas (Berbel-Filho et al., 2018; Rosa et al., 2003).

Do ponto de vista biogeográfico, a distribuição dos peixes de água doce na América do Sul está profundamente estruturada segundo os limites hidrográficos, refletindo processos históricos de vicariância, geodispersão e reconfigurações hidrográficas, como capturas de drenagem, que moldaram a composição das ictiofaunas ao longo do tempo (Albert; Reis, 2011). Esses processos são particularmente marcantes nas regiões periféricas do continente, como a própria MNCE, onde o isolamento hidrográfico, a sazonalidade extrema e as restrições ambientais impõem fortes limitações à dispersão dos peixes (Berbel-Filho et al., 2018; Rosa et al., 2003).

Ainda assim, a história evolutiva das ictiofaunas do Nordeste brasileiro é marcada por episódios de conexão hidrográfica pretérita entre bacias atualmente isoladas, assim como por eventos de isolamento associados a processos geotectônicos e mudanças climáticas (Albert; Reis, 2011; Rosa et al., 2003). Esse cenário explica padrões complexos de distribuição, nos quais coexistem espécies de distribuição restrita, endêmicas de uma única ecorregião, e espécies de ampla distribuição, presentes em múltiplas ecorregiões.

De acordo com Albert & Reis (2011), 54,6% das espécies sul-americanas de peixes de água doce são restritas a uma única ecorregião, enquanto aproximadamente 90% ocorrem em até cinco ecorregiões. Apenas uma fração minoritária possui distribuição

mais ampla, abrangendo seis ou mais, como os casos bem documentados de *Hoplias malabaricus* (41 ecorregiões), *Synbranchus marmoratus* (34) e *Gymnotus carapo* (33). Entretanto, esses padrões de ampla distribuição frequentemente mascaram linhagens crípticas, conforme evidenciado por estudos taxonômicos baseados em análises morfológicas e moleculares (Albert; Reis, 2011).

A própria MNCE é um exemplo notável de como a percepção da diversidade pode ser profundamente afetada por limitações históricas no esforço de amostragem e por revisões taxonômicas recentes. Tradicionalmente considerada uma ecorregião pobre em espécies, tanto devido às suas condições ambientais quanto pela escassez de inventários ictiológicos (Berbel-Filho et al., 2018), trabalhos mais recentes, como o levantamento integrativo de Berbel-Filho et al. (2018), demonstraram que a diversidade é significativamente maior do que se supunha, totalizando 94 espécies nativas, das quais 28% são endêmicas, e com evidências de que esse número pode aumentar com novos estudos.

Além disso, a composição ictiofaunística da MNCE reflete tanto elementos autóctones quanto espécies compartilhadas com ecorregiões vizinhas, como o Maranhão-Piauí, o rio São Francisco e a Mata Atlântica Nordeste (Berbel-Filho et al., 2018; Rosa et al., 2003). As semelhanças entre as ictiofaunas dessas ecorregiões reforçam a ideia de que, apesar do isolamento atual das drenagens e das barreiras impostas pela hidrologia semiárida, existiram períodos de maior conectividade hidrográfica ou dispersão facilitada entre bacias para permitir o intercâmbio biogeográfico entre essas regiões.

Esse contexto é essencial para a interpretação dos resultados do presente estudo. A ausência de registros prévios de determinadas espécies na bacia do rio Mundaú, localizada na porção leste da MNCE, não deve ser interpretada automaticamente como ausência biológica real, mas pode refletir lacunas no esforço amostral, limitações históricas na taxonomia dos grupos ou processos biogeográficos ainda não totalmente esclarecidos (Albert; Reis, 2011; Berbel-Filho et al., 2018; Rosa et al., 2003).

Portanto, a atribuição taxonômica das MOTUs detectadas deve ser realizada considerando não apenas os registros prévios específicos para a bacia, mas também

os registros disponíveis para a própria ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE), bem como a distribuição conhecida nas ecorregiões adjacentes, a afinidade biogeográfica dos táxons envolvidos e a plausibilidade ecológica e evolutiva de sua ocorrência na área de estudo.

4.1.4 Aplicação do Conceito de Riverscape na Bacia do Rio Mundaú

Apesar da crescente preocupação com os impactos antrópicos sobre os ecossistemas aquáticos, ainda não foram conduzidos estudos que apliquem explicitamente o conceito de *riverscape* para investigar a relação entre o uso da terra e a ictiofauna na bacia do rio Mundaú. Pesquisas anteriores na região se concentraram em aspectos como a qualidade ambiental das nascentes (Cavalcanti, 2013), a caracterização dos sistemas ambientais e a dinâmica do uso do solo (Gomes, 2015; Gomes et al., 2016), além da presença de elementos tóxicos e impactos antrópicos nos ecossistemas estuarinos associados à bacia (Dos Santos et al., 2021; Medeiros et al., 2020; Melo-Magalhães et al., 2009).

Embora esses estudos forneçam informações fundamentais sobre as condições ambientais e os impactos humanos na região, a ausência de abordagens integradas que considerem a estrutura da paisagem fluvial em diferentes escalas espaciais e temporais limita a compreensão sobre os mecanismos que determinam a biodiversidade e a estrutura das comunidades de peixes no rio Mundaú. A aplicação do conceito de *riverscape* permitiria avaliar de forma mais abrangente a conectividade ecológica, os efeitos cumulativos das mudanças no uso do solo e a heterogeneidade dos habitats aquáticos, fornecendo subsídios essenciais para estratégias de conservação e manejo sustentável dos recursos hídricos da bacia.

4.2 APLICAÇÕES DO EDNA METABARCODING PARA O ESTUDO DA ESTRUTURA DA ICTIOFAUNA

4.2.1 Princípios, Vantagens e Aplicações do eDNA Metabarcoding

O DNA ambiental (environmental DNA – eDNA) refere-se a fragmentos de material genético liberados por organismos no ambiente, seja na água, no solo ou no ar, sem a necessidade de capturar diretamente os indivíduos para análise (Cristescu; Hebert, 2018; Deiner et al., 2017; Miya et al., 2015). Esses fragmentos podem ser provenientes de células epiteliais, fezes, urina, secreções, gametas ou até mesmo de

tecidos em decomposição, permitindo que a presença de organismos seja detectada de maneira indireta (Deiner et al., 2017; Thomsen; Willerslev, 2015). Essa abordagem contrasta com as metodologias tradicionais de análise genética, que requerem a obtenção direta de amostras biológicas para posterior extração e sequenciamento de DNA. Além disso, o eDNA apresenta a vantagem de permitir a detecção de múltiplas espécies a partir de uma única amostra, facilitando estudos de diversidade e distribuição de organismos aquáticos (Cristescu; Hebert, 2018; Deiner et al., 2017; Thomsen; Willerslev, 2015).

Enquanto o eDNA está sujeito a condições ambientais que impactam diretamente sua estabilidade e integridade, o DNA extraído ou obtido por métodos convencionais a partir de tecidos biológicos encontra-se protegido por estruturas celulares que preservam sua integridade, como membranas celulares e nucleares, além de contar com mecanismos intracelulares de reparo do DNA que minimizam danos durante a vida da célula (Alberts et al., 2022). Em contraste, o eDNA presente no ambiente aquático está exposto a uma variedade de fatores físicos, químicos e biológicos que aceleram sua degradação, promovendo a fragmentação do material genético e reduzindo sua detectabilidade ao longo do tempo. Fatores abióticos, como temperatura, radiação ultravioleta, pH, salinidade, turbidez da água e presença de substâncias químicas, além de fatores bióticos, como a atividade microbiana, desempenham um papel crucial nesse processo (Carvalho et al., 2022; Joseph et al., 2022; Wang et al., 2021). Por exemplo, temperaturas elevadas e alta radiação UV aumentam significativamente a taxa de degradação do eDNA, enquanto o pH extremo e a presença de enzimas nucleases, liberadas por microrganismos, podem quebrar rapidamente as cadeias de DNA (Joseph et al., 2022). Além disso, a detecção do eDNA pode ser influenciada por fatores hidrodinâmicos, como a dinâmica da coluna d'água, o tempo de residência no ambiente e processos de sedimentação, que afetam a distribuição e concentração do material genético em diferentes compartimentos aquáticos (Cristescu; Hebert, 2018).

A alta sensibilidade do eDNA para detectar traços genéticos mesmo em baixas concentrações apresenta desafios, como o risco de contaminação cruzada durante a coleta e as análises laboratoriais, o que pode resultar em falsos positivos (Carvalho et al., 2022). Para mitigar esses riscos e garantir a confiabilidade dos resultados, é fundamental implementar rigorosos protocolos de controle de qualidade em todas as

etapas do processo, desde a amostragem até a análise laboratorial (Barnes; Turner, 2016; Carvalho et al., 2022). Além disso, a aplicação do eDNA requer o desenvolvimento e a adoção de metodologias padronizadas e rigorosas para minimizar erros analíticos, controlar potenciais fontes de contaminação e assegurar a reprodutibilidade dos dados obtidos, especialmente em ambientes com alta biodiversidade, onde a complexidade do material genético pode aumentar o risco de erros (Barnes; Turner, 2016; Carvalho et al., 2022; Zainal Abidin et al., 2022).

A utilização do DNA ambiental (eDNA) como ferramenta de monitoramento biológico tem se consolidado como um método inovador, eficiente, e altamente sensível para a detecção e identificação de espécies em diversos ecossistemas. Sua aplicação revolucionou a ecologia molecular ao permitir o monitoramento da biodiversidade sem a necessidade de métodos invasivos de coleta, reduzindo o impacto sobre as populações naturais em comparação com abordagens tradicionais (Deiner et al., 2017; Kelly et al., 2014; Miya et al., 2015; Miya; Gotoh; Sado, 2020). Inicialmente, os estudos com eDNA focaram na identificação de organismos específicos, aproveitando a alta sensibilidade da técnica para detectar a presença de espécies mesmo em baixas concentrações de material genético no ambiente (Deiner et al., 2017; Pawlowski et al., 2021).

Esse método permite o monitoramento de organismos de difícil amostragem, como espécies raras, de hábitos crípticos, presentes em locais de acesso limitado ou cuja detecção por métodos convencionais exige amostragem intensiva e invasiva (Cantera et al., 2022; Sales et al., 2019; Urban et al., 2023). Um caso exemplar é o estudo conduzido por Mendes de Brito (2024), no qual o eDNA metabarcoding foi aplicado para monitorar a ictiofauna de uma lagoa artificial que funciona como reservatório de uma central hidrelétrica em Minas Gerais. Nesse contexto, *Lophiosilurus alexandri*, uma espécie de bagre conhecida como pacamã, endêmica da bacia do rio São Francisco, Brasil (Shibatta et al., 2021), foi detectada em apenas uma das amostras coletadas, integrando um grupo de oito espécies que apresentaram ocorrências raras ao longo do monitoramento. Da mesma forma, Balasingham et al. (2018) relataram a detecção de espécies de peixes raras, como o *Northern Madtom* (*Noturus stigmosus*), uma espécie considerada ameaçada no Canadá, em tributários dos Grandes Lagos. A presença dessa espécie foi confirmada em locais onde registros anteriores eram

escassos ou inexistentes, destacando a eficácia do eDNA na detecção de organismos com populações reduzidas ou distribuição restrita.

Outro aspecto fundamental do eDNA é sua utilidade na detecção precoce de espécies invasoras, permitindo ações rápidas de manejo e conservação (Kelly et al., 2014). Essa abordagem tem sido utilizada para monitorar espécies invasoras, como a carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), em sistemas aquáticos nos quais a presença desses organismos representa uma ameaça ecológica significativa (Lodge et al., 2012). Além disso, Balasingham et al. (2018) demonstraram a eficácia do eDNA na detecção de espécies invasoras em água doce como o *Round Goby* (*Neogobius melanostomus*), uma espécie agressiva que impacta negativamente a biodiversidade nativa por meio da competição e predação direta. O estudo revelou a presença dessa espécie em locais onde métodos tradicionais de captura não haviam registrado sua ocorrência, evidenciando o potencial do eDNA para identificar populações em estágio inicial de invasão. A sensibilidade do eDNA possibilita não apenas a detecção dessas espécies antes que se estabeleçam e proliferem, mas também facilita ações de manejo e conservação, garantindo uma resposta mais rápida e eficiente na proteção da biodiversidade aquática (Balasingham et al., 2018; Kelly et al., 2014; Lodge et al., 2012).

4.2.2 Aplicações do eDNA Metabarcoding na Biodiversidade Aquática: Avanços e Perspectivas

O avanço das técnicas de metabarcoding expandiu significativamente o potencial do eDNA, permitindo não apenas a identificação de espécies individuais, mas também a caracterização da composição de comunidades inteiras com base no DNA presente em diferentes compartimentos ambientais (Cristescu; Hebert, 2018; Zhu et al., 2023b). O eDNA é capaz de fornecer uma visão abrangente da biodiversidade aquática ao capturar o material genético liberado por organismos em compartimentos como água, sedimentos e biofilmes (Balasingham et al., 2018; Carvalho et al., 2022; Pawlowski et al., 2021). Esse progresso foi impulsionado pela ampliação dos bancos de dados de referência, pela melhoria na anotação de genomas mitocondriais e pela capacidade de reduzir erros de sequenciamento, o que aprimorou a precisão e a eficiência da detecção de espécies em diversos ecossistemas aquáticos (Zhu et al., 2023b).

A aplicabilidade do eDNA em estudos de biodiversidade aquática tem crescido significativamente na última década, estudos pioneiros demonstraram sua aplicação desde 2010, abrangendo diversos tipos de ambientes aquáticos, incluindo rios, lagoas e ambientes marinhos (Cristescu; Hebert, 2018; Miya et al., 2015), resultando especialmente útil em situações onde a amostragem tradicional pode ser desafiadora devido à dificuldade de acesso e ao impacto que os métodos convencionais podem causar nas populações monitoradas (Urban et al., 2023). Além disso, estudos demonstram que essa técnica pode detectar mudanças sazonais na composição das comunidades aquáticas, permitindo avaliar padrões de variação temporal em diferentes ecossistemas (Mendes de Brito, 2024; Milhau et al., 2021; Pont et al., 2023).

No contexto da ictiofauna, o uso do eDNA tem sido amplamente documentado em ambientes marinhos, estuarinos e continentais, demonstrando sua eficiência na identificação e monitoramento de espécies de peixes. Em ecossistemas marinhos, a técnica tem sido empregada para estudar a diversidade de espécies em recifes de coral, zonas costeiras e regiões de mar aberto, onde os métodos tradicionais de captura podem ser limitados (Van Bleijswijk et al., 2020; Yoshitake et al., 2023). Por exemplo, o eDNA demonstrou alta sensibilidade na detecção de espécies pelágicas e bentônicas frequentemente subestimadas por métodos convencionais (Van Bleijswijk et al., 2020), além de revelar variações sazonais na composição de espécies em áreas costeiras influenciadas por fatores ambientais, como a hipóxia e a dinâmica de águas oceânicas (Zhu et al., 2023b).

Em ambientes estuarinos, o eDNA tem se mostrado uma ferramenta eficaz para avaliar a diversidade de peixes, permitindo a detecção de espécies residentes e migratórias, bem como o monitoramento da composição das comunidades em gradientes ambientais complexos (Kumar et al., 2022; Stoeckle; Soboleva; Charlop-Powers, 2017; Zainal Abidin et al., 2022). Estudos demonstram que a técnica é sensível para identificar variações sazonais na abundância de espécies e preferências de habitat, mesmo em ecossistemas com alta turbidez e influências antropogênicas significativas (Stoeckle; Soboleva; Charlop-Powers, 2017), além de superar as limitações dos métodos tradicionais em estuários tropicais megadiversos, como o elevado consumo de tempo, o alto custo e a necessidade de experiência em taxonomia tradicional (Zainal Abidin et al., 2022). A escolha de primers apropriados,

como evidenciado por Kumar et al. (2022), também influencia diretamente a eficiência da detecção em comunidades estuarinas biodiversas.

Já em ecossistemas continentais, incluindo rios, lagos e riachos, o eDNA metabarcoding tem se destacado como uma ferramenta eficaz para o monitoramento da biodiversidade de peixes, permitindo a detecção de espécies em diferentes escalas espaciais e temporais (Dal Pont et al., 2021; Pont et al., 2023; Sales et al., 2021). A técnica tem sido aplicada com sucesso em rios, lagos e reservatórios, revelando padrões de variação na composição das comunidades em resposta a gradientes ambientais e impactos antrópicos, como mudanças no uso da terra e a presença de barragens (Li et al., 2023; Mendes de Brito, 2024). Estudos demonstram que o eDNA é sensível para detectar espécies raras e invasoras, além de captar a dinâmica sazonal e espacial da ictiofauna, superando limitações associadas aos métodos tradicionais de amostragem (Cantera et al., 2024; Timana-Mendoza et al., 2024). Além disso, o uso de abordagens combinadas com análises de diversidade funcional tem ampliado a compreensão das respostas ecológicas das comunidades de peixes frente a alterações ambientais (Cantera et al., 2024). A possibilidade de integrar o eDNA ao conceito de *riverscape*, conforme discutido anteriormente, amplia ainda mais seu potencial, permitindo associar padrões de distribuição da ictiofauna a fatores ambientais e usos do solo ao longo dos gradientes fluviais.

4.2.3 Comparação entre eDNA e Métodos Tradicionais de Amostragem

O eDNA metabarcoding tem se consolidado como uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de monitoramento da ictiofauna, como a pesca elétrica, redes de arrasto e mergulho visual (Bylemans et al., 2018; McDevitt et al., 2019). Estudos comparativos demonstram que o eDNA apresenta uma taxa de detecção superior, especialmente para espécies raras, crípticas ou de difícil amostragem (Pont et al., 2023; Zhu et al., 2023a). Por exemplo, Zhu et al. (2023a) relataram que o metabarcoding de eDNA aquático detectou 258 espécies de peixes em comparação com 54 espécies registradas por redes de arrasto em Tóquio Bay. No entanto, embora o eDNA metabarcoding tenha demonstrado maior sensibilidade de detecção, foi destacado que a composição da ictiofauna visualizada por meio do eDNA (água e sedimento) e por métodos de captura convencional apresentou diferenças significativas, sugerindo que a combinação de dados de amostras de eDNA de água

e sedimento, e capturas pode melhorar a precisão e a representatividade do monitoramento da fauna de peixes.

Em outro estudo, Cantera et al. (2022) relataram que, utilizando a técnica de metabarcoding de eDNA, foram capazes de detectar 160 espécies, o que corresponde a 80% da ictiofauna conhecida em dois grandes rios neotropicais da Guiana Francesa, o rio Maroni e o rio Oyapock. Em comparação, os métodos tradicionais de captura detectaram apenas 94 espécies. Além disso, o padrão de distribuição longitudinal (montante-jusante) das espécies, derivado do eDNA, correspondeu à distribuição conhecida da maioria das espécies. Essa correspondência foi avaliada através da análise da presença das espécies em diferentes pontos do gradiente fluvial, destacando a consistência dos dados de eDNA com as distribuições geográficas previamente documentadas. Esses resultados demonstram que o eDNA fornece um retrato relevante das assembleias locais de peixes, sendo o sinal espacial do eDNA comparável ao obtido por métodos de captura locais, que descrevem a fauna de peixes em escalas de algumas centenas de metros. Ao avaliar o eDNA em rios, é essencial compreender a extensão do transporte do material genético ao longo do rio, para determinar se os dados obtidos representam a biota existente no local específico de amostragem ou vestígios de organismos provenientes de áreas a montante (Cantera et al., 2022; Cristescu; Hebert, 2018).

Por outro lado, Carvalho et al. (2022) realizaram uma meta-análise abrangente comparando a eficiência do eDNA e do iDNA com métodos convencionais em diferentes contextos. Os resultados indicaram que, para amostragens de água focadas em peixes, especialmente em zonas temperadas, o eDNA apresenta um risco menor de não detectar espécies ou de falhar na identificação de locais onde uma espécie-alvo está presente, em comparação com métodos tradicionais. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre os dados de eDNA e a abundância ou biomassa dos peixes, embora essa correlação seja mais forte em experimentos de laboratório do que em condições de campo, provavelmente devido a fatores ambientais que influenciam a degradação do DNA.

4.2.4 eDNA Metabarcoding na Estimativa da Abundância de Peixes

Outro uso chave do eDNA metabarcoding é a estimativa da abundância de peixes em ecossistemas aquáticos. Diversos estudos buscaram correlacionar a abundância

relativa de eDNA com a biomassa real das populações de peixes, tanto em experimentos laboratoriais quanto em condições de campo (Rourke et al., 2022; Takahara et al., 2012; Ushio et al., 2018). Por exemplo, Takahara et al. (2012) conduziram um estudo em ambientes controlados, manipulando a densidade de biomassa de carpas comuns e coletando amostras de água para quantificação do eDNA. O estudo revelou uma correlação positiva significativa entre a concentração de eDNA detectada e a biomassa dos peixes presentes, sugerindo que o eDNA pode ser um indicador confiável da biomassa em contextos controlados.

Buscando aprimorar a confiabilidade dessas estimativas, diferentes técnicas complementares têm sido exploradas ao longo dos últimos anos. Ushio et al. (2018) demonstraram que a incorporação de padrões internos de DNA, ou seja, quantidades conhecidas de DNA exógeno adicionadas às amostras ambientais, é uma estratégia eficaz para calibrar as estimativas de abundância. Essa abordagem contribui para corrigir vieses de amplificação e variações na eficiência da PCR, aumentando a confiabilidade dos resultados. De forma complementar, Pont et al. (2023) destacaram que a combinação do eDNA metabarcoding com técnicas de PCR quantitativa (qPCR) aprimora a robustez das estimativas de abundância, especialmente em comunidades de peixes com alta diversidade, ao permitir uma quantificação mais precisa do DNA de espécies-alvo.

Além do qPCR, avanços tecnológicos levaram ao desenvolvimento da PCR digital em gotículas (ddPCR). O ddPCR funciona particionando a amostra em milhares de microgotículas, permitindo que reações de PCR ocorram de forma independente em cada gotícula. Isso reduz o impacto de inibidores presentes nas amostras ambientais e minimiza o viés de amplificação, comum em métodos tradicionais. Além disso, o ddPCR oferece maior precisão e sensibilidade na detecção de DNA em baixas concentrações quando comparado ao qPCR, além de apresentar menor variação nos resultados (Capo et al., 2019; Doi et al., 2015). De forma complementar, Rourke et al. (2022) destacaram que o ddPCR tem mostrado vantagens em comparação ao qPCR, como a não necessidade de uma curva padrão e uma maior precisão para quantificar DNA em baixas concentrações. Embora atualmente apresente um custo relativo mais elevado, existe a possibilidade de que seu uso se torne mais comum no futuro à medida que a tecnologia evolua e os custos operacionais sejam reduzidos.

O uso da abundância relativa de leituras de DNA (Read Relative Abundance - RRA) tem se consolidado como uma abordagem amplamente utilizada para estimar proxies de abundância em estudos de biomonitoramento aquático. A literatura científica sustenta uma correlação positiva significativa entre o eDNA detectável no ambiente e a abundância ou biomassa de espécies-alvo, com cerca de 90% dos estudos revisados por Rourke et al. (2022) confirmando essa relação. O RRA baseia-se na proporção de leituras de DNA atribuídas a diferentes espécies em amostras ambientais, assumindo que a quantidade de sequências recuperadas está correlacionada com a abundância relativa das espécies presentes. Estudos como os de Mendes de Brito (2024), Sales et al. (2021), Cheng et al. (2023) e Zainal Abidin et al. (2022) tem demonstrado a aplicabilidade do RRA em análises estatísticas e ecológicas, evidenciando sua eficácia em diferentes contextos ambientais. Embora existam outras metodologias quantitativas, o RRA continua sendo amplamente empregado devido à sua simplicidade, baixo custo e capacidade de gerar informações relevantes para o monitoramento da biodiversidade.

Nesse contexto, é importante considerar que a eficácia do RRA e de outras abordagens baseadas em eDNA podem ser significativamente impactadas por diversos fatores bióticos e abióticos. Rourke et al. (2022) identificaram diversos desses fatores que influenciam a concentração de eDNA no ambiente, afetando a precisão das estimativas de abundância e biomassa. Entre os fatores bióticos, destacam-se a biomassa e densidade populacional das espécies, que estão diretamente relacionadas à quantidade de DNA liberado no ambiente. Além disso, a variação intraespecífica na taxa de liberação de DNA, influenciada pelo metabolismo, comportamento, ciclo de vida e estado fisiológico dos organismos, pode impactar significativamente a concentração de eDNA. O tamanho dos organismos e a atividade reprodutiva também são variáveis relevantes, já que espécies em períodos de desova tendem a liberar mais material genético.

Quanto aos fatores abióticos, foram identificados seis principais: fluxo da água, que influencia a dispersão e diluição do eDNA, afetando a detecção em diferentes escalas espaciais; temperatura da água, que acelera a degradação do DNA em temperaturas mais altas; pH, com valores extremos promovendo a degradação mais rápida do material genético; salinidade, que pode afetar tanto a estabilidade do DNA quanto a eficiência da extração; intensidade da luz solar, principalmente devido à radiação

ultravioleta que contribui para a degradação do DNA; e a dinâmica hidrológica, incluindo eventos de precipitação e mudanças sazonais que influenciam a concentração de eDNA através da diluição e do transporte de partículas. O estudo concluiu que, embora o eDNA seja uma ferramenta promissora para o monitoramento de populações aquáticas, é essencial considerar esses fatores para interpretar corretamente os dados obtidos. Além disso, os autores enfatizam a importância de calibrações específicas para cada contexto ecológico, visando reduzir incertezas nas estimativas de abundância e biomassa (Rourke et al., 2022).

4.2.5 Desempenho e Aplicação de Primers no Metabarcoding de eDNA para Estudos da Ictiofauna

O uso de primers universais tem desempenhado um papel fundamental no avanço do metabarcoding de eDNA para o monitoramento da biodiversidade de peixes. Dentre os diversos marcadores genéticos disponíveis, o gene mitocondrial 12S rRNA destaca-se como o mais amplamente utilizado devido à sua alta taxa de cópia, conservação entre táxons e capacidade de discriminar espécies de forma eficiente (Miya et al., 2015; Miya; Gotoh; Sado, 2020; Valentini et al., 2016). Esses atributos tornam o 12S uma escolha preferencial para estudos que buscam detectar múltiplas espécies em amostras ambientais complexas.

Os primers MiFish, desenvolvidos por Miya et al. (2015), representam um marco no metabarcoding de peixes, permitindo a amplificação de um fragmento curto (~170 bp) do gene 12S, adequado para amostras de eDNA, que frequentemente contêm DNA degradado. O MiFish-U, utilizado neste estudo, foi projetado para detectar uma ampla variedade de espécies de peixes em ambientes de água doce e marinhos, com alta sensibilidade e especificidade. Posteriormente, Miya et al. (2020) revisaram e aprimoraram o desempenho dos primers MiFish, expandindo suas aplicações para diferentes ecossistemas aquáticos.

Além dos primers MiFish, outros conjuntos de primers também têm sido amplamente utilizados. Valentini et al. (2016) testaram os primers "Teleo", projetados para amplificar uma curta região do gene 12S em vertebrados aquáticos, com alta eficiência de detecção e especificidade para peixes em ambientes de água doce e marinhos. Milan et al. (2020), focando em ecossistemas neotropicais, desenvolveram novos primers para o gene 12S, denominados "NeoFish", com o objetivo de otimizar

a detecção da diversidade de peixes em regiões megadiversas da América do Sul, onde os primers convencionais mostraram limitações na cobertura taxonômica. Além disso, Riaz et al. (2011) desenvolveram o primer "Riaz_12S", projetado para amplificar regiões conservadas do gene 12S em uma ampla gama de vertebrados, sendo utilizado em estudos de metabarcoding para avaliar a biodiversidade aquática com alta especificidade e eficiência. Esses avanços contribuíram significativamente para aprimorar a precisão e a abrangência dos estudos de metabarcoding de eDNA em diferentes contextos ambientais.

O uso de primers para metabarcoding de eDNA em ecossistemas neotropicais tem se expandido consideravelmente, impulsionado pela necessidade de monitoramento da biodiversidade em regiões de alta diversidade e complexidade ecológica. O primer MiFish (Miya et al., 2015) tem sido amplamente utilizado na América do Sul e no Brasil, demonstrando eficiência na detecção de uma ampla gama de espécies de peixes. No entanto, estudos indicam que sua aplicação em ambientes neotropicais enfrenta desafios, como a incompletude das bases de dados de referência, limitações na detecção de espécies em ecossistemas megadiversos e a necessidade de padronização de protocolos de amostragem e análise (Dal Pont et al., 2021; Jackman et al., 2021; Teixeira et al., 2023).

Comparações entre o desempenho do MiFish e outros primers regionais revelam variações significativas na eficiência de amplificação e na capacidade de discriminar espécies. Teixeira et al. (2023) compararam o desempenho dos primers MiFish, NeoFish e COI na detecção de espécies de peixes neotropicais, utilizando amostras ambientais. Os resultados mostraram que o NeoFish foi capaz de detectar o maior número de ordens, famílias e gêneros, enquanto o MiFish e o NeoFish identificaram o mesmo número de espécies, com ambos sendo eficazes na distinção de espécies congênicas, como *Leporinus piau* e *L. taeniatus*, assim como *Prochilodus argenteus* e *P. costatus*. Apesar da forte correlação positiva entre o MiFish e o COI, observou-se que muitas espécies foram detectadas por apenas um desses marcadores. Além disso, o NeoFish apresentou baixa eficiência na amplificação de sequências de Siluriformes, especialmente da família Pimelodidae, o que influenciou os padrões de abundância detectados em comparação com o MiFish e o COI. Esses resultados reforçam a importância do uso combinado de múltiplos primers para maximizar a

cobertura taxonômica e minimizar vieses de amplificação em programas de monitoramento em larga escala utilizando o metabarcoding de eDNA.

Hilário et al. (2023) realizaram um estudo comparativo em comunidades simuladas (mock communities), revelando que o primer MiFish foi o único capaz de detectar todas as espécies presentes nessas comunidades, apresentando um desempenho superior em relação aos primers NeoFish e Teleo. Esses achados são consistentes com os de Polanco et al. (Polanco F. et al., 2021), que evidenciaram um bom desempenho dos primers MiFish e Teleo em análises *in silico*, destacando a capacidade do Teleo de detectar uma maior diversidade taxonômica em ambientes de água doce e marinhos, enquanto o MiFish apresentou melhor poder de discriminação a nível de espécie. Ambos os estudos reforçam a importância da escolha criteriosa de primers e a recomendação do uso combinado de diferentes marcadores para maximizar a detecção da biodiversidade com eDNA. Além disso, enfatizam a necessidade de realizar experimentos controlados com comunidades de espécies conhecidas antes de grandes investimentos em programas de monitoramento baseados em métodos não invasivos que utilizam o metabarcoding de DNA.

Por outro lado, Kumar et al. (Kumar et al., 2022) realizaram análises comparativas entre os primers MiFish_12S (Miya et al., 2015), Riaz_12S (Riaz et al., 2011), Teleo_12S (Valentini et al., 2016), Berry_16S (Berry et al., 2017) e MacDonald_18S (MacDonald et al., 2014) usando amostras de água da “*Indian River Lagoon*”, um ambiente altamente diverso localizado na Flórida, EUA. Os resultados mostraram que, ao contrário do que se observa em muitos estudos, o MiFish-U_12S não apresentou o melhor desempenho em comparação com outros primers, destacando-se o Riaz_12S, que demonstrou maior eficiência na detecção de espécies. O estudo destacou que, para a maioria dos ecossistemas aquáticos, não existe um primer universal capaz de capturar toda a diversidade presente em uma comunidade. Nesse sentido, ressaltou-se a importância de utilizar primers que amplifiquem diferentes genes barcode sempre que possível. Os autores concluíram que a combinação de regiões genômicas, como 12S e 16S, resultou em uma detecção de biodiversidade mais abrangente e eficiente do que o uso isolado ou conjunto de qualquer primer 12S avaliado.

Apesar de sua ampla aplicação, o primer MiFish-U enfrenta dificuldades na detecção de certos grupos taxonômicos da ictiofauna neotropical. Estudos apontam limitações na amplificação de espécies das ordens Siluriformes, especialmente famílias como Heptapteridae e Pimelodidae, além de desafios na detecção de alguns representantes de Characiformes (Hilário et al., 2023; Jackman et al., 2021; Teixeira et al., 2023). Essas dificuldades estão associadas a variações na sequência do sítio de ligação do primer, o que pode reduzir a eficiência da amplificação e levar à sub-representação ou ausência de determinadas espécies nos resultados de metabarcoding.

Considerando os resultados apresentados por diferentes estudos, torna-se evidente que o uso combinado de múltiplos primers é uma estratégia fundamental para maximizar a detecção da biodiversidade aquática e minimizar vieses de amplificação. A combinação de primers que amplificam diferentes regiões do DNA, como 12S e 16S, demonstrou melhorar a cobertura taxonômica e a capacidade de detecção em ambientes de alta diversidade (Hilário et al., 2023; Kumar et al., 2022; Teixeira et al., 2023). Além disso, a implementação de experimentos controlados com comunidades conhecidas antes da aplicação em larga escala é recomendada para validar a eficácia dos primers e otimizar protocolos de metabarcoding, garantindo maior robustez nos programas de monitoramento da biodiversidade.

4.3 PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA COLETA E ANÁLISE DE EDNA EM AMBIENTES AQUÁTICOS

A padronização dos protocolos de coleta e análise de eDNA é essencial para garantir a consistência, a reprodutibilidade e a comparabilidade dos resultados entre diferentes estudos (Dickie et al., 2018; Ruppert; Kline; Rahman, 2019). A falta de uniformidade nos métodos de filtração, conservação e extração de DNA pode impactar significativamente a detecção de espécies e a robustez das análises (Cantera et al., 2019; Sales et al., 2019). Diferentes métodos têm sido utilizados, cada um com vantagens e limitações específicas, o que reforça a importância de diretrizes padronizadas para minimizar variabilidades metodológicas (Bruce et al., 2021; Carim et al., 2016b).

Esta seção apresenta uma revisão dos métodos de coleta de eDNA em ambientes aquáticos, com ênfase em ecossistemas fluviais, destacando esforços de

padronização, especialmente em regiões neotropicais e no Brasil (Jackman et al., 2021; Ruan et al., 2022).

4.3.1 Métodos de Coleta de eDNA e Esforço de Amostragem em Ambientes Aquáticos

Os métodos de coleta de eDNA em ambientes aquáticos variam de acordo com as características do ecossistema e os objetivos do estudo. A filtração de água é o método mais utilizado, especialmente em rios, onde volumes de água entre 1 e 4000 mL são comumente coletados para capturar partículas de DNA suspensas na coluna d'água (Sakata et al., 2021). Em locais com alta turbidez, onde a filtração pode ser menos eficiente, a precipitação de DNA surge como uma alternativa viável para concentrar o material genético (Ruan et al., 2022). Além disso, o uso de amostras de sedimentos complementa as coletas de água, permitindo uma detecção mais abrangente das espécies devido à maior estabilidade do DNA em ambientes sedimentares, o que pode prolongar o tempo de detecção após o desprendimento do organismo de origem (Sakata et al., 2021).

Esforços significativos foram realizados para padronizar a coleta de eDNA, com destaque para o volume de água filtrada e o número de réplicas por ponto de amostragem. Cantera et al. (2019) demonstraram que a filtração de volumes entre 34 e 68 litros de água por ponto de amostragem é suficiente para inventariar a maioria da fauna em ecossistemas tropicais de alta diversidade. Nesse trabalho foi utilizado o conjunto de primers Teleo (Valentini et al., 2016) em corpos d'água da Guiana Francesa, caracterizados por clima equatorial, alta diversidade de peixes e baixa influência de atividades humanas. As coletas foram realizadas em áreas de fluxo turbulento, com o objetivo de garantir uma melhor homogeneização do eDNA na coluna d'água.

Usando o primer MiFish-U (Miya et al., 2015), Sakata et al. (2021) recomendaram volumes de amostragem de até 1000 mL para otimizar a detecção de espécies em rios pequenos, observando que volumes maiores não necessariamente aumentam a eficiência da detecção após um certo limite. Além disso, a repetição de amostras tem se mostrado fundamental para aumentar a robustez dos dados, sendo recomendado o uso de pelo menos três réplicas por local para otimizar a detecção de espécies e reduzir a variabilidade dos resultados entre coletas.

No Brasil e em outras regiões neotropicais, os protocolos de amostragem têm sido ajustados para se adequarem às condições locais, visando otimizar a detecção da biodiversidade aquática. Em estuários neotropicais, Ruan et al. (2022) recomendaram a filtração direta de 1 a 2 litros de água combinada com diferentes métodos de extração de DNA, para melhorar a detecção de espécies em ambientes estuarinos, caracterizados por ser altamente dinâmicos e heterogêneos.

Além do volume de água e do número de réplicas, a escolha do local de amostragem é um fator crítico que influencia diretamente a representatividade dos resultados obtidos. Fatores hidrológicos, como o fluxo da água, a velocidade da corrente e a profundidade, podem afetar a distribuição do DNA ambiental. A heterogeneidade do habitat, incluindo variações na estrutura física do ambiente, na composição do substrato e na presença de vegetação aquática, também pode impactar a concentração e a diversidade do eDNA detectado (Dickie et al., 2018). Considerar esses aspectos é essencial para garantir que as amostras reflitam com precisão a biodiversidade presente no ecossistema estudado.

4.4 CASOS DE ESTUDO: APLICAÇÕES DO EDNA METABARCODING NA AVALIAÇÃO DA ICTIOFAUNA

4.4.1 Sales (2019) - **Barcoding and eDNA metabarcoding of a rapidly changing Neotropical freshwater fish community**

O estudo de Sales (2019) teve como objetivo avaliar a biodiversidade de peixes utilizando o metabarcoding de eDNA para investigar as mudanças na estrutura e composição da ictiofauna em resposta à distância longitudinal entre os pontos, à influência de represas e a variáveis temporais. As amostragens foram realizadas na bacia do rio Jequitinhonha, Brasil, em duas temporadas de amostragem. Foram coletados 1 litro de água e 250 mL de sedimento por local, com seis réplicas de água por ponto de amostragem.

O DNA foi extraído utilizando kits comerciais (Qiagen) otimizados para amostras ambientais, e a amplificação foi realizada com primers MiFish-U para o gene 12S rRNA. O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina MiSeq, e o processamento dos dados incluiu pipelines bioinformáticos específicos para metabarcoding, baseados na suíte OBITools. A atribuição taxonômica foi realizada

utilizando o ecotag, onde cada MOTU foi atribuída a uma espécie com base em uma similaridade de sequência de 97% em relação às referências disponíveis (identidade 0,97). MOTUs bem representadas, mas com similaridade inferior a 97%, foram apresentadas e discutidas como pertencentes, possivelmente, a espécies ainda ausentes nos bancos de dados de referência. O risco de falsos positivos devido à contaminação e ao fenômeno de tag jumping foi mitigado de duas maneiras: (1) subtraindo o número total de leituras detectadas nos controles negativos para cada MOTU em todas as amostras, e (2) descartando MOTUs com menos de cinco leituras no total, reduzindo o risco de detecções espúrias e aumentando a confiabilidade dos resultados

Para as análises estatísticas, foi aplicada uma abordagem conservadora tratando os resultados com base na ocorrência. As análises estatísticas foram realizadas no software R v3.5.1. As réplicas de amostras foram agrupadas para cada local (6 amostras por local) antes das análises subsequentes. A diversidade alfa (riqueza de espécies) foi estimada como o número total de MOTUs atribuídos ao nível de espécie em cada ponto de amostragem.

A diversidade beta foi calculada utilizando a distância de Jaccard por meio do pacote `vegan` versão 2.5-2, utilizando o comando `"vegdist"`. Para visualizar as relações entre os locais de amostragem, foram gerados gráficos de PCoA (Análise de Coordenadas Principais) com base na matriz de diversidade beta, utilizando o comando `"cmdscale"`. A correlação entre a diversidade beta e a distância longitudinal, bem como entre a diversidade beta e a presença de barreiras físicas (barragens), foi testada usando o teste de Mantel (comando `"mantel.rtest"`).

A matriz de distâncias foi reconstruída com base nas distâncias entre os locais de amostragem. Para testar a influência de barreiras físicas, foi construída uma matriz atribuindo valores de distância entre os locais de acordo com a presença de barreiras (0 – ausência de barreira física entre os locais, 1 – uma barreira entre os locais e 2 – duas barreiras).

Entre seus principais achados estão: o eDNA metabarcoding permitiu identificar uma diversidade de espécies maior do que registros anteriores, incluindo tanto espécies nativas quanto exóticas. Aproximadamente 30% das espécies detectadas

eram não nativas, destacando o potencial do eDNA para o monitoramento de invasões biológicas. A análise da diversidade beta indicou que a distância longitudinal e a presença de barreiras físicas não explicaram de forma significativa a variação na composição das comunidades de peixes. No entanto, locais próximos a barragens apresentaram menor riqueza de espécies, enquanto áreas com menor influência de atividades antrópicas mostraram maior diversidade.

4.4.2 Dal Pont et al. (2021) - Monitoring fish communities through environmental DNA metabarcoding in the fish pass system of the second largest hydropower plant in the world

O estudo de Dal Pont et al. (2021) teve como objetivo avaliar a eficácia do eDNA metabarcoding para o monitoramento da ictiofauna no Canal da Piracema, um sistema de transposição de peixes que conecta o rio Paraná ao reservatório de Itaipu. O foco principal foi investigar como o barramento e o canal de transposição afetam a composição das comunidades de peixes e comparar a eficácia do eDNA com campanhas anteriores de amostragem tradicional utilizando três abordagens bioinformáticas diferentes.

Foram coletados 1 litro de água, com seis réplicas por ponto de amostragem. O DNA ambiental foi extraído usando esferas magnéticas que se ligam ao DNA pelo processo de Imobilização Reversível em Fase Sólida (SPRI). O DNA extraído foi amplificado utilizando primers MiFish-U, seguido de sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq. Três controles negativos (água destilada) foram utilizados como controle para extração, amplificação e sequenciamento. Para a análise dos dados, foram utilizados diferentes pipelines bioinformáticos (DADA2, UPARSE e UNOISE) para a detecção de ASVs, OTUs e ZOTUs. Todas as sequências foram revisadas manualmente com o BLAST para avaliação taxonômica, atribuiu-se cada sequência a uma espécie com base em uma similaridade mínima de 97% em relação às referências disponíveis, garantindo maior precisão na identificação taxonômica. O risco de falsos positivos por contaminação foi mitigado removendo todas as ASVs, ZOTUs e OTUs com uma proporção superior a 0,01% de leituras nos controles negativos.

As análises estatísticas incluíram estimativas de diversidade alfa (riqueza de espécies, Chao1, índice de Fisher) e beta (Foram construídas ordenações

bidimensionais de Análise de Coordenação Principal (PCoA) com base nos dados de abundância (número de leituras) e presença/ausência, considerando tanto os dados rarefeitos quanto os calculados com números de Hill. A função 'cmdscale' e as distâncias de Bray–Curtis do pacote vegan foram utilizadas para avaliar a dissimilaridade entre as comunidades em todas as amostras. O método 'envfit' do pacote vegan foi empregado para ajustar as localidades de amostragem e os anos de coleta à ordenação PCoA, como uma medida de correlação entre os locais de amostragem e os eixos da PCoA.

Os principais achados indicaram que diferentes abordagens bioinformáticas, como ASVs, OTUs e ZOTUs, produzem resultados semelhantes em termos de diversidade alfa e beta. O uso do eDNA metabarcoding demonstrou ser capaz de detectar a maioria das espécies de peixes presentes na comunidade. No entanto, muitas outras unidades moleculares foram identificadas com menos de 97% de similaridade, que pode incluir parte das 76 espécies amostradas por métodos tradicionais que não possuem sequências disponíveis. Mesmo com essas limitações, essa abordagem permite avaliar a diversidade e facilita comparações entre diferentes locais e dinâmicas espaço-temporais. Por fim, destaca-se que os dados moleculares derivados do sequenciamento ambiental devem ser vistos como complementares, e não concorrentes, aos estudos taxonômicos tradicionais.

4.4.3 Li et al. (2023) - Environmental DNA metabarcoding reveals the impact of different land use on multitrophic biodiversity in riverine systems

O estudo de Li et al. (2023) teve como objetivo investigar o impacto do uso da terra sobre a biodiversidade multitrófica em sistemas fluviais, utilizando metabarcoding de eDNA para avaliar como diferentes regimes de uso da terra influenciam a estrutura e a composição das comunidades aquáticas. Foram analisadas quatro categorias de uso da terra em diferentes trechos do Rio Dongjiang, na China: áreas pouco impactadas, áreas impactadas a montante, áreas impactadas a jusante e áreas altamente impactadas ao longo de todo o sistema fluvial.

Em cada ponto, foram coletados 3 litros de água superficial, filtrando volumes de 300-500 mL em membranas de 0,45 µm, totalizando seis réplicas por local. O DNA extraído foi amplificado utilizando primers específicos para diversos grupos taxonômicos, incluindo bactérias (16S rRNA), algas e protozoários (18S rRNA),

insetos aquáticos (COI) e peixes (12S rRNA). O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina MiSeq, e os dados foram processados no pipeline VSEARCH/USEARCH.

As variáveis ambientais e espaciais analisadas incluíram características físico-químicas da água (pH, turbidez, concentração de nutrientes e poluentes) e cobertura do solo. As análises estatísticas incluíram ANOVA para comparar diferenças nos parâmetros ambientais e na diversidade alfa entre os diferentes grupos de uso da terra. A diversidade beta foi avaliada por meio de nMDS e PERMANOVA, utilizando as distâncias de Jaccard (para peixes e insetos) e de Bray-Curtis (para os demais grupos) além do teste de Mantel para correlacionar a dissimilaridade da estrutura das comunidades com os gradientes de uso da terra. Modelos lineares generalizados (GLMs) foram aplicados para avaliar a relação entre variáveis ambientais e a composição das comunidades biológicas. A análise SIMPER foi utilizada para identificar os táxons mais responsáveis pelas diferenças entre os grupos, e redes de coocorrência foram construídas para avaliar mudanças nas interações ecológicas.

Os principais achados indicaram que o uso da terra afeta diretamente a carga de poluentes no ambiente aquático, influenciando a estrutura das comunidades. Apesar de não haver uma redução expressiva na diversidade alfa, a composição das comunidades foi significativamente alterada em resposta ao uso da terra, evidenciado por mudanças nos táxons dominantes e nas redes de coocorrência. Nas áreas altamente impactadas, observou-se um aumento na presença de espécies invasoras e uma homogeneização das comunidades aquáticas. Além disso, os resultados reforçaram a importância do eDNA metabarcoding como ferramenta para o monitoramento de impactos ambientais, destacando sua capacidade de detectar mudanças sutis na estrutura das comunidades antes que essas variações sejam perceptíveis em métricas tradicionais de diversidade.

4.4.4 Deng et al. (2024) - eDNA metabarcoding reveals differences in fish diversity and community structure in Danjiang River

O estudo de Deng et al. (2024) teve como objetivo utilizar o eDNA metabarcoding para investigar a influência de fatores ambientais sobre a diversidade e a estrutura das comunidades de peixes no Rio Danjiang, China. O estudo buscou também

comparar a eficácia dessa abordagem com métodos tradicionais de amostragem (*ground cages*).

As amostragens foram realizadas em quatro pontos do rio, abrangendo diferentes condições ambientais. Foram coletados 1 litro de água superficial em cada ponto, com três réplicas por local. A filtragem foi realizada em membranas de 0,45 µm utilizando uma bomba peristáltica. O DNA extraído foi amplificado utilizando primers MiFish-U, seguido de sequenciamento em plataforma DNBSEQ-G99. O processamento bioinformático foi conduzido com o pipeline DADA2 para controle de qualidade, remoção de quimeras e formação de ASVs (*Amplicon Sequence Variants*).

As variáveis ambientais analisadas incluíram temperatura da água, pH, potencial de oxirredução (ORP), turbidez, condutividade e concentração de nutrientes. Além disso, fatores como profundidade do rio, tipo de sedimento e cobertura vegetal ripária foram registrados para avaliar a influência do habitat na composição das comunidades de peixes.

As análises estatísticas incluíram índices de diversidade alfa (Shannon, Simpson, Pielou, Chao1 e ACE) para avaliar a riqueza e equitabilidade das comunidades. O grau de cobertura foi medido utilizando a cobertura de Good (%) e o software QIIME 2 (2023.2). A diversidade beta foi analisada utilizando Bray-Curtis e Jaccard para medir a dissimilaridade entre amostras, com visualização por meio de NMDS e PCoA. A relação entre a estrutura da comunidade e as variáveis ambientais foi avaliada por meio de Análise de Redundância (RDA). A análise SIMPER foi utilizada para identificar os principais táxons que contribuem para as diferenças entre os locais amostrados.

Os principais achados indicaram que a diversidade de peixes no Rio Danjiang é fortemente influenciada por fatores ambientais, especialmente temperatura, pH e ORP. Comparado aos métodos tradicionais, o eDNA metabarcoding detectou um número significativamente maior de espécies, incluindo espécies raras e pouco amostradas anteriormente.

4.4.5 Mendes de Brito (2024) - Emprego do eDNA metabarcoding na investigação da biodiversidade de peixes de um reservatório urbano

O estudo de Mendes de Brito (2024) teve como objetivo avaliar a aplicabilidade do eDNA metabarcoding para a caracterização da biodiversidade de peixes em um reservatório urbano, a Lagoa dos Ingleses, localizada em Nova Lima, Minas Gerais, Brasil. Além disso, o estudo comparou diferentes protocolos de coleta de eDNA para verificar qual metodologia apresenta maior eficiência na recuperação da diversidade da ictiofauna.

As amostragens foram realizadas em cinco campanhas de coleta, distribuídas entre os anos de 2020 e 2022, abrangendo períodos de seca e cheia da lagoa. Foram coletadas amostras de 500 mL de água em quatro pontos fixos ao longo do reservatório, com três réplicas por ponto. Dois métodos de filtração foram comparados: filtros abertos de éster de celulose mista (MCE, 0,45 µm) e filtros cartucho do tipo Sterivex (PVDF, 0,45 µm), sendo que no caso do Sterivex, a filtração foi realizada diretamente em campo. O DNA foi extraído utilizando o kit DNeasy PowerWater (Qiagen), e a amplificação foi feita com os primers MiFish-U. O sequenciamento foi realizado em plataformas Illumina MiniSeq e NextSeq 2000, com o processamento das sequências conduzido no pipeline DADA2, gerando *Amplicon Sequence Variants* (ASVs) e, posteriormente, agrupando-as em OTUs utilizando o Swarm v3.1.0.

As análises estatísticas contemplaram índices de diversidade alfa (riqueza de espécies, Shannon, Simpson e equitabilidade de Pielou), e diversidade beta foi calculada por meio das distâncias de Jaccard, com visualização em análises PCoA e NMDS. A Análise SIMPER foi utilizada para identificar as espécies que mais contribuíram para as diferenças entre amostras, enquanto a relação entre os métodos de coleta foi analisada utilizando teste t pareado e correlação de Pearson. A relação entre os métodos de coleta foi analisada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson.

Os principais achados indicaram que o protocolo de filtração impacta diretamente a detecção de espécies, sendo que os filtros Sterivex recuperaram um maior número de espécies, mesmo com menor volume de água filtrado. Espécies exóticas, como *Coptodon rendalli* e *Oreochromis niloticus*, apresentaram alta frequência de detecção,

sugerindo que o eDNA pode ser um importante instrumento para monitoramento de invasões biológicas. O estudo também demonstrou que o eDNA metabarcoding pode ser uma ferramenta eficaz para biomonitoramento de reservatórios urbanos.

4.4.6 Kang et al. (2024) - Land use characteristics affect the sub-basinal scale urban fish community identified by environmental DNA metabarcoding

O estudo de Kang et al. (2024) teve como objetivo investigar como as características do uso da terra e ordem dos cursos de água influenciam a estrutura da comunidade de peixes utilizando o metabarcoding de eDNA, na rede hidrográfica do riacho Anyang, na Coreia do Sul.

As amostragens foram realizadas em 31 locais distribuídos ao longo do riacho principal e seis afluentes. Foram coletados 240 mL de água por ponto, filtrados com Sterivex (0,45 µm) e armazenados a -20°C até a extração do DNA, realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). A amplificação do DNA utilizou primers MiFish, e o sequenciamento foi conduzido na plataforma Illumina MiSeq. A identificação taxonômica foi feita pelo pipeline MiFish, utilizando o banco de dados MitoFish com um limiar de similaridade de 97%.

As variáveis analisadas incluíram uso da terra em diferentes escalas espaciais (buffer de 500m e bacias hidrográficas), características físico-químicas da água (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade), elevação e ordem do curso d'água (1ª a 3ª ordem). Para avaliar os efeitos ambientais sobre a estrutura da comunidade de peixes, foram aplicadas regressões múltiplas com efeitos fixos, considerando variáveis como uso da terra, ordem do rio e características físico-químicas da água. As variáveis explicativas foram selecionadas por eliminação bidirecional baseada no Critério de Informação de Akaike (AIC), e verificou-se multicolinearidade pelo Fator de Inflação da Variância (VIF). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças significativas na estrutura da comunidade entre ordens dos rios, seguido do teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni para comparações post-hoc. A ANOSIM foi aplicada para verificar diferenças na composição das comunidades entre diferentes ordens dos rios, enquanto NMDS foi usada para visualizar os padrões de distribuição das espécies e avaliar a influência de variáveis ambientais na estrutura da comunidade.

Os principais achados indicaram que o uso da terra impacta significativamente a diversidade de peixes, com áreas urbanas e florestadas associadas a maior riqueza e abundância de espécies ($p < 0.05$), enquanto áreas agrícolas apresentaram uma correlação negativa ($p < 0.05$). A condutividade da água foi um fator chave, sendo mais elevada em áreas agrícolas e correlacionada com menor riqueza de espécies. Além disso, a composição da comunidade variou ao longo das ordens dos rios, com um declínio de espécies sensíveis e aumento de espécies tolerantes em rios de maior ordem ($p < 0.01$).

A diversidade foi maior em locais com cobertura vegetal mais densa e menor em áreas impactadas pela agricultura, refletindo a degradação ambiental causada pelo uso intensivo da terra. A análise de NMDS evidenciou que o uso da terra, a condutividade e a temperatura da água, assim como a ordem do rio, desempenham papéis fundamentais na organização das comunidades de peixes.

O estudo reforça a importância do eDNA metabarcoding como ferramenta para o monitoramento da biodiversidade em ambientes urbanos, demonstrando que as características do uso da terra modulam a estrutura das comunidades aquáticas e que a restauração ecológica pode mitigar parte dos impactos da urbanização sobre a ictiofauna.

4.4.7 Li et al. (2024) - Environmental DNA biomonitoring reveals the human impacts on native and non-native fish communities in subtropical river systems

O estudo de Li et al. (2024) teve como objetivo utilizar o metabarcoding de eDNA para analisar como o uso da terra e a poluição da água influenciam a diversidade taxonômica e funcional das comunidades de peixes nativas e não nativas no Rio Dongjiang, um importante sistema fluvial subtropical no sudeste da China.

Foram coletadas amostras de água em 45 locais, abrangendo o canal principal e três afluentes, com três réplicas de 1 litro por ponto. O eDNA foi filtrado em membranas hidrofílicas de nylon (0,45 μm), armazenado a -20°C e extraído utilizando o kit DNeasy PowerWater (Qiagen). A amplificação foi realizada com os primers Tele02F e Tele02R, direcionados ao gene 12S rRNA mitocondrial, e o sequenciamento ocorreu na plataforma Illumina MiSeq PE150. O processamento

bioinformático foi realizado com os pipelines VSEARCH e USEARCH11, com um limiar de 97% de similaridade para a classificação taxonômica das OTUs.

As variáveis analisadas incluíram uso da terra (agricultura, vegetação, superfícies impermeáveis e corpos d'água, em buffer de 5 km) e parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura, condutividade, sólidos dissolvidos totais e oxigênio dissolvido), além de concentrações de poluentes como nitrogênio total (TN), fósforo total (TP) e índice de permanganato (COD).

As análises estatísticas incluíram a Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) para verificar a estrutura dos dados e a Análise de Redundância (RDA) para identificar variáveis ambientais associadas à estrutura das comunidades de peixes. A seleção de variáveis explicativas foi realizada pelo método ordistep2 (seleção progressiva com 999 permutações), e a multicolinearidade foi testada com VIF (>5). A dissimilaridade entre comunidades foi avaliada com matrizes de distância de Jaccard, e um teste de Mantel parcial foi aplicado para correlacionar a composição das comunidades com gradientes de uso da terra, controlando a distância geográfica. Além disso, Modelos Aditivos Generalizados (GAMs) foram utilizados para examinar a relação entre diversidade de peixes e variáveis ambientais, empregando um critério de suavização por splines de regressão.

Os resultados indicaram que a poluição da água e o uso da terra explicaram entre 27.8% e 31.56% da variação estrutural das comunidades de peixes. Para peixes nativos, os fatores mais influentes foram TDS, TP e COD. Para peixes não nativos, o oxigênio dissolvido (DO) foi o principal fator associado à variação na estrutura da comunidade. Além disso, a diversidade taxonômica e funcional dos peixes nativos apresentou uma tendência decrescente significativa com o aumento da poluição e do uso da terra, enquanto as comunidades de peixes não nativos não foram afetadas significativamente.

O estudo destaca que espécies nativas mais sensíveis, como *Parabramis pekinensis* e *Tachysurus nitidus*, foram detectadas em maior frequência em áreas com menor carga de poluentes, enquanto espécies exóticas, como *Oreochromis niloticus* e *Coptodon zillii*, apresentaram alta frequência em toda a extensão do rio, independentemente dos níveis de poluição. Esses achados sugerem que espécies

invasoras possuem maior tolerância a impactos antrópicos e podem substituir espécies nativas em ambientes degradados.

O estudo reforça a eficácia do eDNA metabarcoding como ferramenta para biomonitoramento da biodiversidade, evidenciando sua capacidade de detectar mudanças estruturais nas comunidades de peixes em resposta a impactos humanos.

4.5 SÍNTESE DOS MÉTODOS UTILIZADOS NOS ESTUDOS DE EDNA METABARCODING

Os estudos analisados utilizaram abordagens padronizadas para a coleta, extração e análise do eDNA metabarcoding na investigação da biodiversidade de peixes em diferentes contextos ambientais e geográficos. A seguir, são sintetizados os principais métodos empregados nos sete trabalhos revisados.

4.5.1 Coleta de Amostras e Extração de eDNA

A coleta de eDNA foi realizada majoritariamente a partir de amostras de água superficial, com volumes variando entre 240 mL e 3 litros por ponto amostral. O número de réplicas por local variou entre três e seis, sendo mais comum o uso de três réplicas. A filtração foi conduzida utilizando dois tipos principais de filtros: (i) filtros do tipo Sterivex, equipados com membranas de PVDF (0,45 µm), e (ii) filtros abertos, compostos por membranas de éster de celulose mista (MCE) ou nylon (0,45 µm), sendo ambos amplamente empregados nos estudos revisados. O DNA foi extraído utilizando os kits comerciais DNeasy PowerWater (Qiagen) e DNeasy Blood & Tissue (Qiagen).

4.5.2 Primers Utilizados

Os primers mais utilizados foram:

- MiFish-U (12S rRNA) – Aplicado na maioria dos estudos, por sua alta eficiência na detecção de peixes.
- Tele02F e Tele02R (12S rRNA) – Usado nos estudos de Li et al. (2023; 2024) para análise detalhada da ictiofauna.

4.5.3 Pipelines Bioinformáticos

Os principais pipelines utilizados para o processamento de sequências foram:

- DADA2 – Método mais comum para filtragem de qualidade e inferência de ASVs.
- VSEARCH / USEARCH – Utilizado para clustering de OTUs em alguns estudos.
- OBITools – Aplicado para controle de qualidade e classificação taxonômica.
- QIIME 2 – Empregado para análises de diversidade e cobertura amostral.

4.5.4 Critérios para Atribuição Taxonômica

Os critérios mais adotados para a identificação taxonômica incluíram:

- Similaridade mínima de 97% com bancos de dados de referência.
- Uso de bases como MitoFish, NCBI GenBank e bibliotecas locais.

4.5.5 Variáveis Utilizadas

Os estudos analisaram uma ampla gama de variáveis, incluindo:

- Espaciais: Distância entre pontos amostrais, ordem dos rios.
- Uso da terra: Proporção de áreas urbanas, agrícolas, vegetação ripária em diferentes escalas (buffers de 500m a 5km, bacias).
- Temporais: Comparação entre períodos de seca e cheia.
- Locais e ambientais: pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, turbidez, concentração de nutrientes (nitrogênio, fósforo), potencial de oxirredução (ORP).

4.5.6 Estatísticas e Índices Utilizados

Os métodos estatísticos mais aplicados incluíram:

- Diversidade alfa: Shannon, Simpson, Pielou, Chao1, ACE.
- Diversidade beta: Distâncias de Bray-Curtis e Jaccard, analisadas via PCoA, NMDS e PERMANOVA.
- Modelos Estatísticos: ANOVA, regressão múltipla, Modelos Aditivos Generalizados (GAMs), Regressão LOESS.
- Correlações e Testes de Significância: Teste de Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney, análise SIMPER, teste de Mantel parcial.
- Seleção de Variáveis: Eliminação baseada no Critério de Informação de Akaike (AIC), Fator de Inflação da Variância (VIF).

4.5.7 Principais Respostas Obtidas

Os estudos forneceram insights valiosos sobre a biodiversidade de peixes e os impactos ambientais. As principais descobertas incluem:

- O uso da terra e a poluição da água foram identificados como os principais fatores estruturantes das comunidades de peixes.

- Áreas urbanas e florestadas tendem a apresentar maior riqueza de espécies, enquanto áreas agrícolas e poluídas mostram redução na diversidade e aumento de espécies tolerantes.
- A estrutura das comunidades de peixes variou significativamente ao longo do gradiente longitudinal dos rios e entre períodos de cheia e seca.

4.5.8 Conclusões e Recomendações

Com base nos estudos analisados, o eDNA metabarcoding se mostrou uma ferramenta robusta para monitoramento da biodiversidade de peixes, permitindo uma detecção mais abrangente das espécies e uma avaliação mais detalhada dos impactos ambientais. As principais recomendações incluem:

- Aprimorar bancos de dados de referência para reduzir incertezas na atribuição taxonômica.
- Utilizar múltiplos pontos e réplicas para garantir uma melhor cobertura espacial da biodiversidade.
- Considerar a influência do uso da terra e variáveis ambientais na análise da estrutura das comunidades.
- Considerar o uso de filtros Sterivex para otimizar a recuperação de DNA e aumentar a eficiência das coletas.
- Incorporar modelos estatísticos avançados (GAMs) para explorar padrões não lineares e avaliar mudanças na biodiversidade de forma mais detalhada.

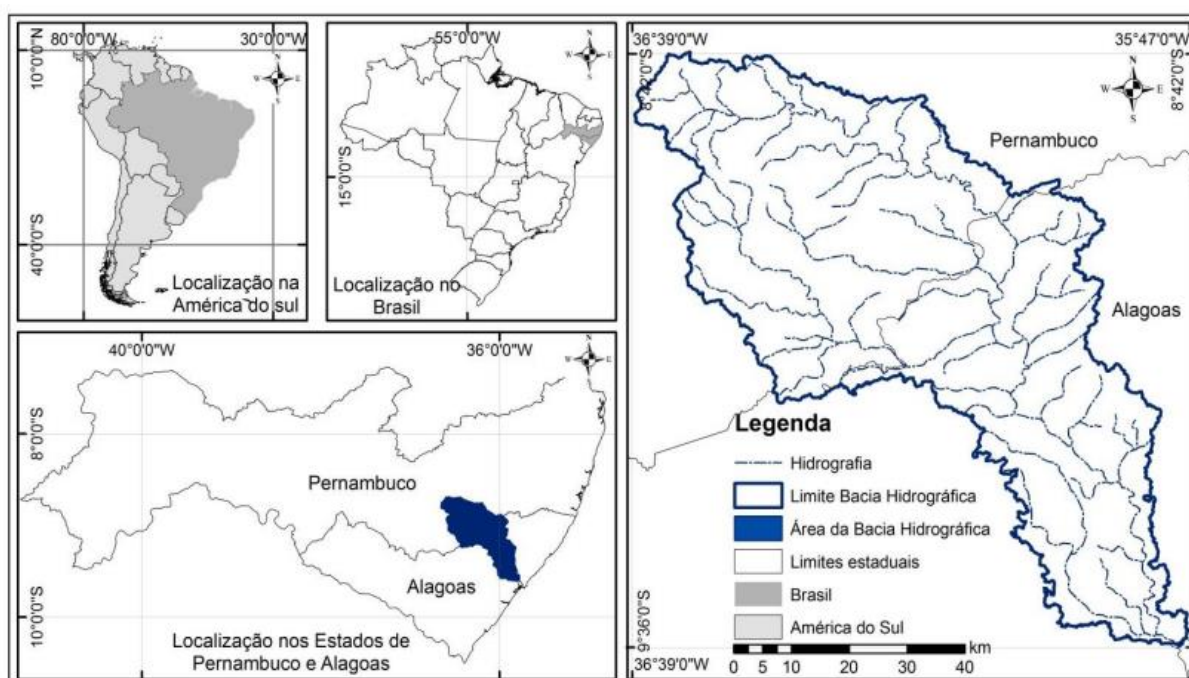
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDO

5.1.1 Descrição geográfica da Bacia do Rio Mundaú (AL-PE).

A bacia do rio Mundaú, localizada na região nordeste do Brasil, estende-se pelas mesorregiões do Agreste Pernambucano e do Leste Alagoano, abrangendo os estados de Pernambuco e Alagoas. Geograficamente, a bacia está situada entre as coordenadas 8°42' a 9°36' de latitude sul e 36°39' a 35°47' de longitude oeste, conforme indicado na Figura 2.

Figura 2 - Localização da bacia hidrográfica do Rio Mundaú



Fonte: Mapeamento e caracterização dos sistemas ambientais da bacia hidrográfica do Rio Mundaú - PE/AL. Retirado de Gomes et al., 2016.

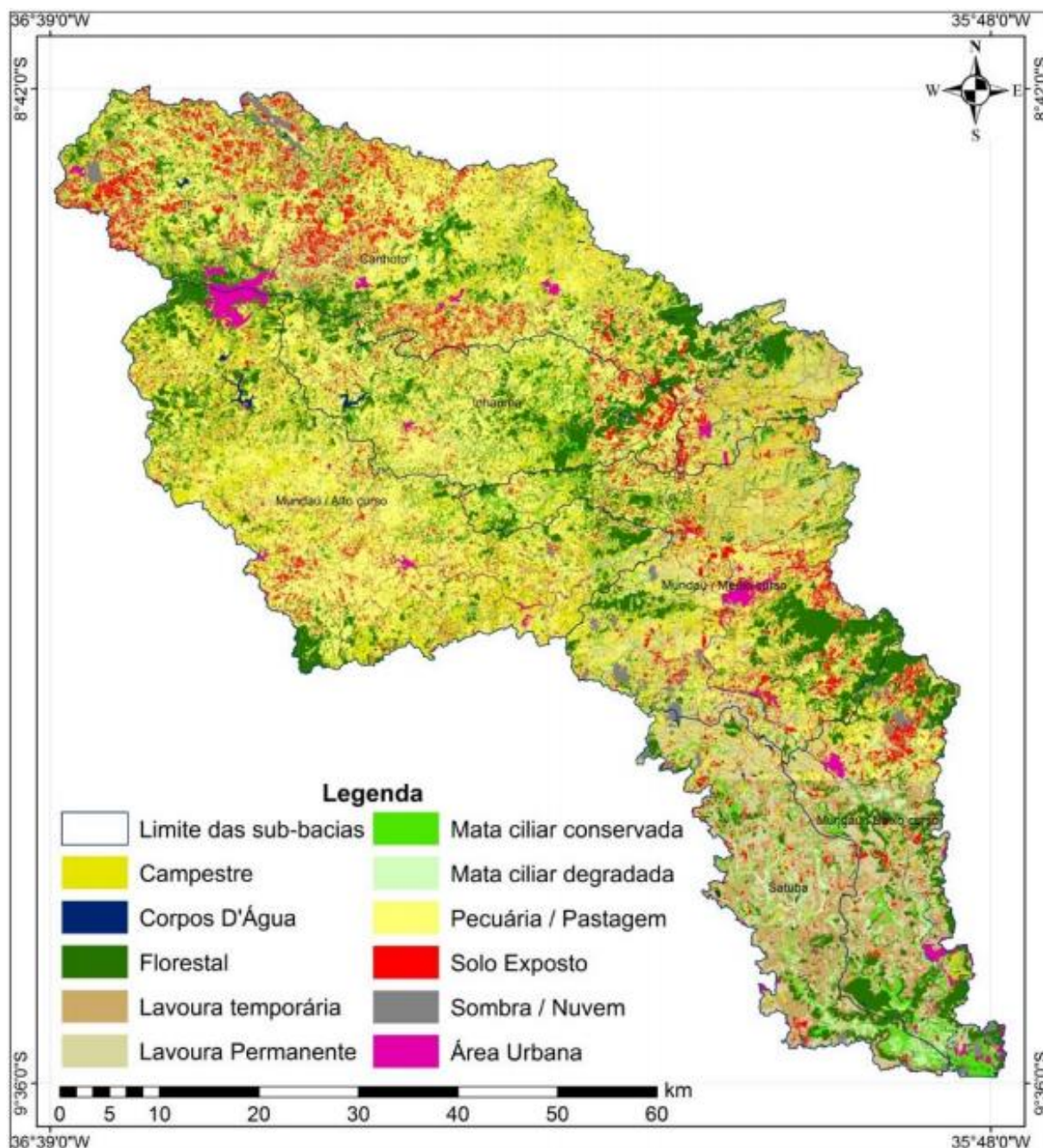
O rio Mundaú possui um curso principal de aproximadamente 195 km, com sua nascente situada na Chapada da Borborema e sua foz na Lagoa Mundaú. A área total da bacia é de 4.101,90 km², distribuída entre os dois estados: 54,2% em Pernambuco, abrangendo 16 municípios, e 47,8% em Alagoas, cobrindo 17 municípios (Cavalcanti, 2013; Gomes et al., 2016).

De acordo com sua hierarquia fluvial, a bacia do rio Mundaú é classificada como de sétima ordem e pode ser dividida em seis sub-bacias principais: Alto, Médio e Baixo

Mundaú, além das sub-bacias Canhoto, Inhaúma e Satuba, que representam os principais afluentes do sistema hidrográfico (Gomes, 2015).

5.1.2 Uso e Cobertura do Solo na Bacia do Rio Mundaú

Figura 3 - Cobertura e uso do solo na bacia hidrográfica do Rio Mundaú.



Fonte: Mapeamento e caracterização dos sistemas ambientais da bacia hidrográfica do Rio Mundaú - PE/AL. Retirado de Gomes et al, 2016.

De acordo com as características de uso e cobertura da terra na bacia do Rio Mundaú (Figura 3), sabe-se que 29.88% da área total da bacia é destinada à pecuária,

que inclui áreas de pastagens naturais e representa a maior uso da terra na bacia hidrográfica. Cerca de um terço da área dedicada a esta atividade encontra-se na sub-bacia do Canhoto (Gomes et al., 2016).

Quanto ao uso da terra para atividade agrícola, entre cultivos permanentes e temporários, temos uma representatividade de 6.01% da área total, dentro das espécies cultivadas em toda a bacia, destacam-se: banana, café arábica, café canéfora, coco e laranja (Gomes et al., 2016).

Em relação às áreas urbanas, compostas por cidades, vilas, vilas, áreas de autoestradas de serviço, transportes, energia, comunicações e terrenos associados; representam 1.25% da área total da bacia (Gomes et al., 2016).

Quanto às florestas, são definidas como áreas com formações arbóreas com altura superior a 5m, podendo incluir florestas primárias e secundárias resultantes de processos de reflorestamento. Juntos representam 17.26% da área total da bacia. Cerca de um terço da área, este tipo de cobertura encontra-se na sub-bacia do Canhoto (Gomes et al., 2016).

Além disso, a bacia abriga diversas unidades de conservação de importância ecológica, como: APA de Santa Rita, destinada à preservação das características ambientais do Complexo Estuário-Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM). APA do Catolé e Fernão Velho, que protege parte do Baixo Mundaú e contribui para o abastecimento de 30% da cidade de Maceió. APA de Murici, importante para a conservação da biodiversidade regional.

5.2 SELEÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM

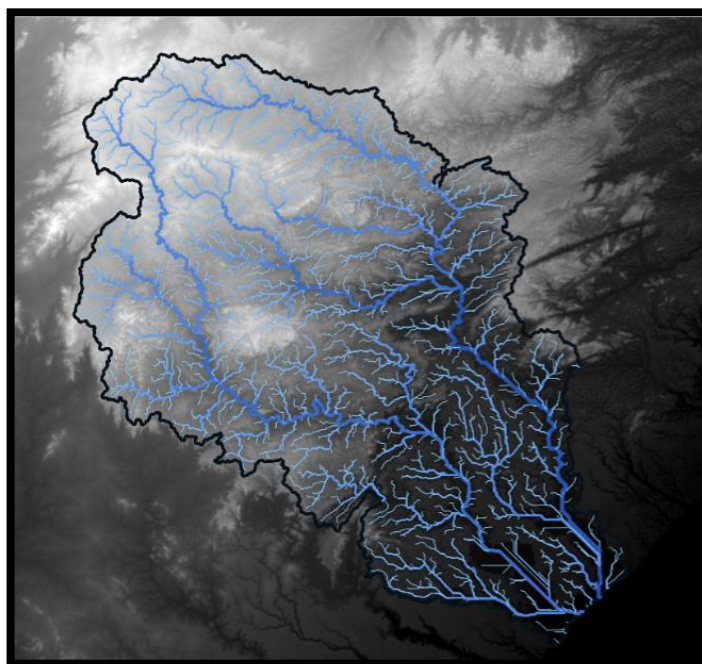
5.2.1 Definição da Rede Hídrica e Classificação dos Tributários

A rede hídrica da bacia do Rio Mundaú foi gerada a partir de modelos digitais de elevação (DEM) com resolução espacial de 30 metros, obtidos no The Alaska Satellite Facility (<https://search.asf.alaska.edu/>). O processamento dos dados foi realizado no QGIS ver. 3.28.2, seguindo as diretrizes do manual oficial (<https://docs.qgis.org/3.28/en/docs/>) e vídeos tutoriais sobre geração de redes hidrográficas e bacias a partir de DEMs.

O processo de extração da rede hidrográfica envolveu a aplicação de um filtro de acúmulo de fluxo mínimo, a fim de remover pequenos cursos d'água irrelevantes para o estudo. Em seguida, foi gerada a rede vetorial de drenagem, que serviu de base para a definição dos tributários e pontos de amostragem.

A classificação dos tributários foi realizada com base na hierarquia de números de Strahler, que considera a confluência dos cursos d'água para definir sua ordem: riachos de primeira ordem são aqueles sem afluentes e, à medida que tributários se unem, a ordem aumenta (Gerhard, 2005). Essa abordagem foi essencial para garantir a comparabilidade entre os pontos de amostragem, uma vez que a ordem fluvial influencia a estrutura e a composição da ictiofauna. Por isso, a seleção foi restrita a riachos de primeira, segunda e terceira ordem, com o objetivo de minimizar variações hidrológicas e controlar parcialmente fatores naturais da rede de drenagem, permitindo isolar melhor os efeitos do uso da terra sobre a ictiofauna.

Figura 4 - Mapa da rede hídrica da bacia do rio Mundaú, Estados de Pernambuco e Alagoas. A linha preta delimita a área da bacia. A espessura das linhas azuis claras corresponde ao número Strahler de cada tributário. Fonte: Elaboração própria.



5.2.2 Definição do Uso da Terra e Combinação com a Rede Hídrica

Para estabelecer a relação entre a rede hidrográfica e os diferentes tipos de paisagem, um mapa de uso e cobertura do solo foi obtido do Living Atlas of the World (<https://livingatlas.arcgis.com/>), com resolução espacial de 10 metros. Esse mapa foi sobreposto à rede hídrica previamente gerada, permitindo a identificação das categorias de uso predominante do solo em diferentes seções da bacia.

A sobreposição dessas camadas geospaciais foi fundamental para a seleção criteriosa dos pontos de amostragem, garantindo que representassem adequadamente as variações ambientais presentes na bacia.

5.2.3 Locais de Amostra e Variáveis Espaciais

As unidades amostrais (riachos) foram selecionadas com base na acessibilidade, bem como na independência entre os locais, tomando especial cuidado para que nenhum dos locais amostrais seja afluente de outro. Foram definidos 24 pontos de coleta, distribuídos em áreas classificadas conforme o uso predominante do solo dentro de um buffer de 50 m de largura em ambos os lados do riacho e 1 km de comprimento a montante do local da amostra (Dala-Corte et al., 2016; Frimpong et al., 2005). Os pontos de amostragem foram definidos com base nos seguintes critérios:

Os pontos de amostragem foram definidos considerando uma distribuição equitativa entre as principais categorias de uso da terra, totalizando seis pontos para cada uma das seguintes categorias: floresta, lavoura, pecuária e área urbana. A seleção também levou em conta a representatividade espacial, garantindo que os locais escolhidos abrangessem diferentes trechos da bacia e respeitassem critérios como a independência hidrológica entre os pontos e a predominância de um único tipo de uso do solo dentro da área de buffer ripário. Além disso, priorizou-se a acessibilidade dos pontos para permitir uma coleta de amostras eficiente e segura.

A independência hidrológica entre os pontos de amostragem foi cuidadosamente considerada, assegurando que nenhum riacho fosse afluente de outro. Esse critério, aliado à padronização da ordem dos tributários, contribuiu para evitar efeitos hierárquicos e garantir comparabilidade entre os locais estudados.

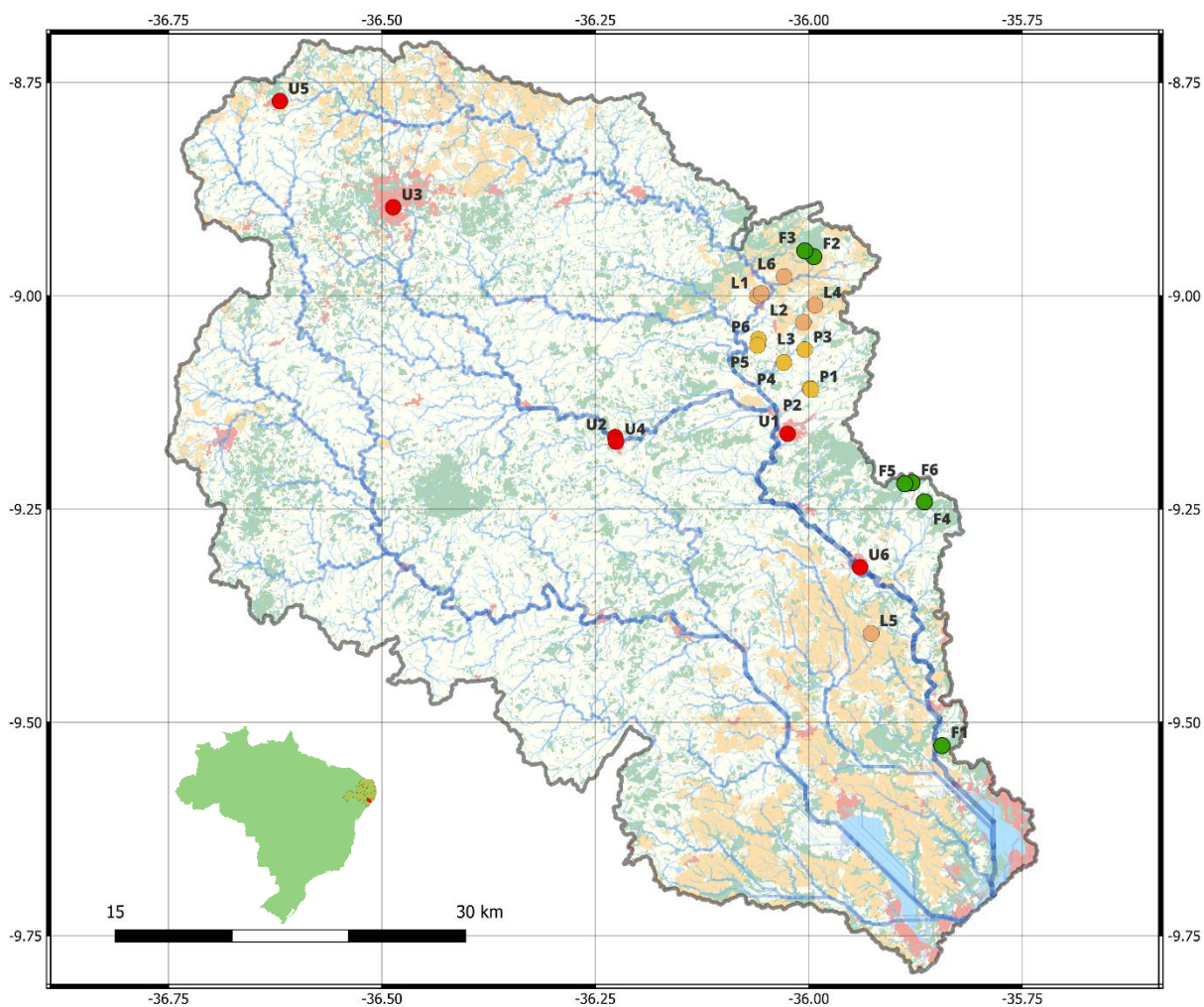
Os 24 pontos de amostragem selecionados são apresentados na Figura 5 e detalhados na Tabela 1, incluindo:

- **Código do Ponto:** Identificação única para cada local amostrado.
- **Tipo de Uso da Terra:** Classificação conforme a predominância do uso do solo (Floresta, Lavoura, Pecuária, Urbana).
- **Coordenadas (Latitude/Longitude):** Essenciais para a localização geoespacial dos pontos.
- **Altitude (m):** Influência na distribuição da ictiofauna e processos hidrológicos.
- **Ordem de Strahler:** Hierarquia dos tributários para análise da rede hidrográfica.

Tabela 1 - Localidades dos pontos de amostragem na bacia do rio Mundaú

Ponto	Tipo de Uso da Terra	Latitude	Longitude	Altitude	Ordem de Strahler
F1	Floresta	-9.52726	-35.844	9	2
F2	Floresta	-8.95419	-35.9941	363	2
F3	Floresta	-8.94738	-36.0047	399	2
F4	Floresta	-9.24156	-35.8645	249	2
F5	Floresta	-9.22036	-35.8875	545	2
F6	Floresta	-9.21915	-35.8791	560	1
L1	Lavoura	-8.99978	-36.0601	264	2
L2	Lavoura	-8.99726	-36.0556	271	2
L3	Lavoura	-9.03096	-36.0063	271	2
L4	Lavoura	-9.01105	-35.9928	372	2
L5	Lavoura	-9.39572	-35.9269	127	2
L6	Lavoura	-8.97766	-36.0291	295	2
P1	Pecuária	-9.1098	-35.9974	160	3
P2	Pecuária	-9.10849	-35.9985	166	2
P3	Pecuária	-9.06318	-36.0047	220	3
P4	Pecuária	-9.07826	-36.0292	191	2
P5	Pecuária	-9.0582	-36.0601	233	2
P6	Pecuária	-9.05113	-36.059	238	2
U1	Urbana	-9.16183	-36.0247	143	3
U2	Urbana	-9.16572	-36.2268	212	2
U3	Urbana	-8.89631	-36.4868	776	2
U4	Urbana	-9.17097	-36.2258	214	3
U5	Urbana	-8.77193	-36.6194	834	2
U6	Urbana	-9.31818	-35.94	89	1

Figura 5 - Mapa da rede hídrica da bacia do rio Mundaú, Estados de Pernambuco e Alagoas, e cobertura e uso de solo, incluindo pontos de amostragem.



Pontos de amostragem

- ★ Floresta
- Lavoura
- Pecuaria
- ▲ Urbana

Número de Strahler

- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- Bacia Mundaú

Cobertura e uso de solo

- Water
- Trees
- Flooded vegetation
- Crops
- Built Area
- Bare ground
- Snow/Ice
- Clouds
- Rangeland

5.2.4 Variáveis Locais e Caracterização do Habitat

A caracterização do habitat físico e das variáveis ambientais locais foi realizada com o objetivo de compreender a influência das condições físicas do rio sobre a estrutura e composição da comunidade de peixes detectada por eDNA. As seguintes variáveis foram medidas ao longo dos trechos amostrados:

Velocidade do Fluxo e Vazão: A velocidade da corrente foi medida utilizando o método “*Neutrally Buoyant Object Procedure*” (Peck et al., 2006). A vazão do rio foi estimada com base no método da área-velocidade, por meio de medições transversais de profundidade e largura em cada local amostrado.

Profundidade: A profundidade foi registrada ao longo de cinco transectos perpendiculares ao fluxo do rio, distribuídos equidistantemente dentro do trecho de amostragem, que foi padronizado em 50 metros sempre que possível. Em locais com restrições de acesso, o comprimento do trecho foi **ajustado proporcionalmente**, mantendo a distribuição equidistante dos transectos. Em cada transecto, cinco medições foram realizadas em pontos aproximadamente iguais às seguintes proporções da largura do rio: 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, e 0,9 (Peck et al., 2006). Embora não se trate de um perfil batimétrico completo, esta abordagem permite a obtenção de um perfil transversal representativo da variação de profundidade do rio.

Largura do Canal: A largura do rio foi determinada com base nos transectos descritos anteriormente, onde foram realizadas cinco medições ao longo do trecho de amostragem. A largura foi mensurada desde a borda de uma margem até a borda oposta, considerando a zona de fluxo ativo.

Tipos de Substrato: Tipos de Substrato: A caracterização do substrato seguiu uma categorização padronizada, realizada por meio de inspeção visual, identificando a presença ou ausência dos seguintes tipos de material no leito do rio, classificados com base no seu tamanho: sedimento fino ($\leq 0,06$ mm), areia ($> 0,06$ a 2 mm), cascalho/grava (> 2 a 64 mm), seixo/cobble (> 64 a 250 mm), matacões/boulder (> 250 a 4000 mm) e rocha matriz (> 4000 mm) (Peck et al., 2006).

Presença de Vegetação Submersa: A vegetação aquática submersa foi categorizada conforme sua estrutura e composição (Peck et al., 2006), incluindo:

- Troncos submersos
- Galhos submersos
- Folhiço acumulado (serrapilheira)
- Macrófitas aquáticas, incluindo: Plantas aquáticas enraizadas e Gramíneas aquáticas vivas.

Classificação das Unidades de Habitat do Canal: Os habitats presentes no canal foram categorizados de acordo com as classes de unidades de habitat fluvial (Peck et al., 2006), seguindo uma abordagem qualitativa baseada em observação direta. As categorias consideradas foram:

- **Fluxo laminar** (águas calmas, *glides*)
- **Poças** (poças profundas e de fluxo reduzido, *pools*)
- **Corredeiras** (águas rápidas, fluxo turbulento, *rapids*)
- **Cachoeiras** (pequenas quedas, fluxo muito turbulento, *cascades*)
- **Quedas d'água** (quedas d'água abruptas, *falls*)

Vegetação Ripária: A estrutura da vegetação ripária foi classificada em três grandes grupos com base na altura e forma de crescimento:

- **Arbórea:** árvores com dossel fechado ou semiaberto ao longo das margens.
- **Arbustiva:** vegetação lenhosa de menor porte, como arbustos e pequenas árvores.
- **Herbácea:** vegetação rasteira, incluindo gramíneas e outras plantas herbáceas.

A cobertura da vegetação ripária foi quantificada com base na dominância ao longo das margens, seguindo uma escala padronizada (Peck et al., 2006).

- **0** = ausente (cobertura de 0%)
- **1** = esparsa (<10%)
- **2** = moderada (10-40%)
- **3** = densa (40-75%)
- **4** = muito densa (>75%)

5.3 PROTOCOLO DE COLETA DE EDNA

A coleta de eDNA foi realizada seguindo os protocolos estabelecidos por Laramie et al. (2015) e Carim et al. (2016a) com adaptações para as condições específicas da bacia do Rio Mundaú. O método envolveu a filtragem de água para capturar DNA de organismos aquáticos. Para minimizar contaminações, todas as etapas da coleta seguiram rigorosos procedimentos de controle de qualidade, incluindo o uso de materiais esterilizados e a adoção de medidas preventivas no campo.

A coleta foi realizada a montante do ponto de acesso ao rio, garantindo que não houvesse contaminação pelas atividades dos pesquisadores. Antes de cada coleta, os operadores utilizaram luvas descartáveis e desinfetaram todos os equipamentos com hipoclorito de sódio a 10%, seguido de enxágue com etanol a 70% e posteriormente com água destilada.

Os seguintes materiais foram empregados na coleta e filtragem do eDNA, conforme Carim et al. (2016a), com adaptações para este estudo:

- Frascos estéreis de polietileno para coleta das amostras.
- Filtros GVS DMEFC/RMEFC Glass Microfiber (1,2 μm , 45 mm) para retenção do eDNA.
- Bomba peristáltica alimentada por bateria para o processo de filtração.
- Tubulação de silicone descartável para conexão entre amostras e bombas.
- Luvas descartáveis e desinfetantes (hipoclorito de sódio a 10%) para evitar contaminações.
- Etiquetas e marcadores permanentes para identificação das amostras.
- Sílica gel para preservação das amostras antes do processamento laboratorial.

Para cada ponto de amostragem, foram coletados três litros de água, divididos em três réplicas independentes de 1 litro cada, totalizando 72 amostras de água nos 24 pontos de coleta. A coleta de réplicas é essencial para aumentar a eficiência da captura de DNA e a probabilidade de detecção de eDNA alvo (Shu; Ludwig; Peng, 2020). A coleta foi feita diretamente da coluna d'água superficial, utilizando frascos de polietileno estéreis, que foram previamente lavados e tratados para evitar contaminações cruzadas.

A filtragem ocorreu *in situ* imediatamente após a coleta, utilizando uma bomba peristáltica alimentada por bateria, conforme descrito por Carim et al. (2016b). Foi filtrada a totalidade do volume de água coletado por amostra. No entanto, para as amostras provenientes de áreas urbanas, foi coletada uma alíquota homogeneizada de 500 ml, pois essas amostras continham alta carga de material particulado, o que resultava no entupimento rápido dos filtros. Todas as amostras foram processadas utilizando filtros GVS DMEFC/RMEFC de microfibras de vidro, 1,2 μm de poro e 45 mm de diâmetro, previamente esterilizados. O uso da bomba peristáltica garantiu um fluxo controlado, permitindo uma filtração uniforme, minimizando o risco de entupimento prematuro dos filtros e melhorando a retenção do DNA ambiental sem causar degradação mecânica.

Após a filtragem, os filtros contendo o material genético foram armazenados em sacos plásticos herméticos com sílica gel, garantindo a preservação local das amostras até seu processamento laboratorial.

5.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EDNA

A extração do eDNA foi realizada no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) da Universidade Federal de São Carlos, em um ambiente controlado e exclusivo para trabalhos com amostras de eDNA. Os equipamentos utilizados na extração foram previamente descontaminados com hipoclorito de sódio 10% e etanol 70%. Além disso, antes e depois de cada atividade na sala, foi utilizada luz UV para garantir a eliminação de possíveis contaminantes de DNA. Controles negativos foram incluídos em todas as etapas do processo para monitorar eventuais contaminações.

O procedimento seguiu o protocolo do fabricante do Qiagen DNEasy® Blood and Tissue Kit, com modificações descritas por Carim et al. (2016a). O processo compreendeu lise celular, separação do DNA de contaminantes e inibidores, e purificação final, assegurando a extração eficiente de DNA de baixa concentração a partir das amostras filtradas.

5.5 PCR E SEQUENCIAMENTO DE EDNA

As amostras de eDNA, juntamente com os controles negativos, foram enviadas para amplificação em um laboratório privado, acompanhadas dos dados de quantificação. O DNA enviado já havia sido previamente purificado durante o processo de extração utilizando o Qiagen DNEasy® Blood and Tissue Kit. No entanto, o laboratório reportou que muitas amostras não amplificaram satisfatoriamente, possivelmente devido à presença de compostos inibidores. Para resolver esse problema, foi realizada uma segunda purificação com beads magnéticas antes de uma nova tentativa de amplificação. O serviço contratado incluiu a amplificação do DNA utilizando primers MiFish (Tabela 2). Os primers MiFish, desenvolvidos por Miya et al. (2015), foram projetados para amplificar uma região hipervariável do gene 12S rRNA mitocondrial, proporcionando um alto nível de resolução taxonômica na identificação da ictiofauna. A região alvo tem aproximadamente 163–185 pb e apresenta alta

especificidade para peixes. O sequenciamento paired-end foi realizado na plataforma Illumina iSeq®, utilizando o kit de reagentes iSeq v2 300 ciclos (2x150 pb).

Tabela 2 - Sequências dos primers MiFish-U utilizados na amplificação do DNA

Primer	Sequência (5'-3')
MiFish-U Forward	GTCGGTAAACTCGTGCCAGC
MiFish-U Reverse	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

5.6 PROCESSAMENTO DE SEQUÊNCIAS E ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA

O processamento das sequências obtidas no sequenciamento seguiu um pipeline bioinformático padronizado para controle de qualidade, filtragem de reads, remoção de artefatos e atribuição taxonômica. Esse fluxo de trabalho foi baseado na metodologia aplicada no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) e descrito em estudos recentes sobre metabarcoding de eDNA (Saranholi et al., 2023, 2024), garantindo alta confiabilidade no processamento das sequências.

A primeira etapa consistiu na avaliação da qualidade das sequências utilizando FastQC. Em seguida, as sequências foram demultiplexadas utilizando `process_radtags` no software Stacks v2.64 (Catchen et al., 2013), onde os identificadores de barcodes (tags) foram empregados para rastrear a informação de cada amostra individualmente e evitar erros de atribuição. Posteriormente, os primers e sequências adaptadoras foram removidos para garantir que apenas os fragmentos alvo fossem mantidos para análise.

Após o demultiplexing com `process_radtags`, as leituras paired-end foram unidas utilizando PEAR v0.9.11 (Paired-End reAd mergeR) (Zhang et al., 2014). Esse software reconstrói sequências sobrepostas a partir das extremidades forward e reverse. A fusão das sequências seguiu os seguintes critérios: um limiar de qualidade mínima (-q) de 15, um overlap mínimo (-v) de 40 pb e um comprimento mínimo (-n) de 80 pb. Esses parâmetros foram ajustados para otimizar a retenção de leituras de alta qualidade e minimizar o impacto de erros de sequenciamento.

Após a fusão das leituras paired-end, as sequências foram filtradas e processadas utilizando VSEARCH para remover redundâncias e eliminar sequências de baixa abundância. Em seguida, a remoção de quimeras foi realizada com Uchime3 denovo, garantindo que apenas sequências autênticas fossem mantidas para análise. A inferência de MOTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) foi conduzida por clusterização de similaridade ($\geq 97\%$), permitindo agrupar sequências geneticamente próximas.

Após a geração das MOTUs por amostra, observou-se a presença de MOTUs redundantes entre estações, frequentemente com diferenças de apenas 0–2 pares de bases. Para reduzir essa sobreestimação e obter uma estimativa mais realista da riqueza total, foi realizada uma reclusterização das MOTUs previamente geradas, utilizando o algoritmo VSEARCH, com um novo corte de 98% de similaridade.

Além disso, as MOTUs resultantes desse processo foram alinhadas manualmente no software Geneious, permitindo uma inspeção detalhada das sequências. Por meio dessa etapa, foi possível verificar, caso a caso, que as MOTUs mantinham efetivamente uma similaridade inferior a 98% entre si. Quando identificadas MOTUs cuja diferença correspondia a 0 ou 1 par de bases, elas foram fusionadas manualmente em uma única MOTU, garantindo assim que o agrupamento refletisse uma delimitação biológica mais conservadora e robusta.

Por fim, foi gerada uma matriz de contagem de reads por MOTU para posterior análise taxonômica e ecológica. MOTUs com abundância relativa inferior a 0,05% das leituras dentro de cada pool sequenciado foram descartadas, evitando a inclusão de sequências raras que poderiam representar artefatos de amplificação.

As MOTUs resultantes foram comparadas com o banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando a ferramenta BLASTn, aplicando um critério de similaridade mínimo de 97% para atribuição ao nível de espécie e uma cobertura mínima de 90%. Para garantir a precisão na identificação taxonômica, a validade das espécies nominiais foi verificada com base no Eschmeyer's Catalog of Fishes (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2025), assegurando que os nomes atribuídos estivessem atualizados e seguissem a nomenclatura taxonômica mais recente.

A atribuição de MOTUs ao nível de espécie foi aceita somente quando a espécie correspondente apresentava ocorrência confirmada na área de estudo ou na ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE), conforme registros em fontes primárias, como artigos científicos revisados por pares e listas taxonômicas oficiais (Berbel-Filho et al., 2018; Gurgel-Lourenço et al., 2023; Pereira Filho et al., 2023; Teixeira et al., 2017).

Quando a espécie identificada por similaridade não constava em checklists ou fontes primárias específicas da região, foram utilizados como suporte dados de distribuição geográfica disponíveis na literatura ou registros complementares em plataformas como GBIF, speciesLink e da International Union for Conservation of Nature (IUCN). Estes últimos foram empregados apenas em casos em que a presença da espécie na região poderia ser considerada plausível com base em evidências adicionais, e não como fonte principal de confirmação.

Quando uma sequência apresentou correspondência com duas ou mais espécies, a identidade foi definida com base na ocorrência esperada segundo as fontes citadas, priorizando a evidência de presença regional. Quando a sequência apresentou alta similaridade com uma espécie sem registro confirmado na área ou ecorregião, foi atribuída a um congênera com ocorrência documentada.

Nos casos em que a correspondência de alta similaridade envolvia múltiplas espécies dentro de um mesmo gênero, a identificação foi restringida ao nível de gênero. Embora a informação sobre a distribuição geográfica possa, em alguns casos, auxiliar na distinção entre espécies similares, optou-se por não realizar atribuições ao nível específico quando a similaridade genética era ambígua, a fim de evitar identificações potencialmente incorretas. Sequências com similaridade entre 95% e 97% em relação às entradas do GenBank foram também classificadas apenas no nível de gênero, enquanto aquelas com similaridade abaixo de 95% foram atribuídas a níveis taxonômicos superiores, como família ou ordem. Sequências com menos de 90% de similaridade foram consideradas não identificáveis e não atribuídas taxonomicamente.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a diversidade e a estrutura da comunidade de peixes na Bacia do Rio Mundaú, foram aplicadas análises estatísticas baseadas em abundância relativa de reads (RRA) obtidas pelo metabarcoding de eDNA. A escolha dessa abordagem permite evitar transformações complexas de dados e manter a proporcionalidade das leituras obtidas no sequenciamento, garantindo comparações estatísticas consistentes entre os locais amostrados.

Embora a abordagem bioinformática inicial tenha gerado MOTUs, a unidade de investigação adotada para as análises de diversidade e estrutura da comunidade foi a espécie nominal. Assim, a abundância relativa de reads (RRA) foi calculada para cada espécie nominal em cada amostra, resultando em uma matriz de abundância padronizada utilizada nas análises estatísticas.

5.7.1 Curvas de Acumulação de Espécies

Para avaliar a suficiência do esforço amostral na captura da diversidade da ictiofauna foram geradas curvas de acumulação de espécies (SAC) (Gotelli; Colwell, 2001) utilizando o método de permutação aleatória. Esse método estima a taxa de descoberta de novas espécies à medida que novas amostras são adicionadas, permitindo avaliar se a riqueza acumulada se estabiliza, indicando um esforço amostral adequado, ou se continua ascendente, sugerindo a necessidade de amostragens adicionais.

A construção das curvas foi realizada no software R (R Core Team, 2024), utilizando a função *specaccum* do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2025), com 1000 permutações aleatórias para calcular intervalos de confiança.

5.7.2 Diversidade Alfa

A diversidade dentro de cada ponto amostral foi avaliada por meio de diferentes índices ecológicos, que permitem caracterizar a estrutura e a composição da comunidade de peixes detectada. A riqueza observada de espécies (Sobs) foi determinada pelo número total de espécies nominais detectadas em cada estação de coleta, representando a diversidade bruta. Para avaliar a diversidade foi utilizado o

índice de Shannon-Wiener (H'), que mede a complexidade da comunidade com base na distribuição das abundâncias das espécies (Magurran, 2004; Moreno, 2001).

Além disso, o índice de Simpson (1-D) foi empregado para avaliar a dominância das espécies nominais na comunidade, sendo menos sensível à presença de espécies raras em comparação com Shannon-Wiener. Já a equitatividade da comunidade foi analisada pelo índice de Pielou (J'), que expressa o grau de uniformidade na distribuição das abundâncias relativas das espécies nominais, indicando se a comunidade é dominada por poucas espécies ou se há uma distribuição mais homogênea (Magurran, 2004; Moreno, 2001).

Todas as análises foram conduzidas no software R, utilizando os pacotes da biblioteca *vegan* para o cálculo dos índices de diversidade.

5.7.3 Comparação entre Áreas com Diferentes Tipos de Uso da Terra

Para testar as diferenças na diversidade de Shannon-Wiener (H') entre os diferentes tipos de uso do solo (Floresta, Lavoura, Pecuária e Urbana), foram utilizados métodos estatísticos não paramétricos, apropriados para dados que não seguem uma distribuição normal.

Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, uma alternativa não paramétrica à ANOVA, adequado para a comparação de mais de dois grupos independentes sem a suposição de normalidade dos dados. Para as comparações múltiplas entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney com correção de Benjamini-Hochberg (BH), que controla o erro Tipo I sem comprometer excessivamente a potência estatística (Zar, 2010).

Todos os testes foram implementados no software R, utilizando as funções *kruskal.test()* para o teste global e *pairwise.wilcox.test()* com *p.adjust.method = "bh"* para as comparações post-hoc.

5.7.4 Diversidade Beta e Estrutura da Comunidade

A diversidade beta foi avaliada para quantificar a variação na composição da ictiofauna entre os diferentes locais de amostragem. Para isso, foi construída uma matriz de dissimilaridade baseada no índice de Bray-Curtis (Magurran, 2004), que considera tanto a presença/ausência das espécies quanto suas abundâncias relativas.

Esse índice é amplamente utilizado em estudos de metabarcoding de eDNA, pois captura gradientes de dominância entre os locais amostrados e reflete as diferenças na composição da comunidade com base na abundância relativa de reads (RRA).

Para analisar os padrões de variação na composição da comunidade entre os diferentes tipos de uso da terra, foram aplicadas três abordagens complementares. Primeiramente, a Análise de Escalonamento Não Métrico (NMDS) foi utilizada como principal ferramenta de ordenação para visualizar as diferenças na estrutura da comunidade ictiofaunística entre os diferentes tipos de uso do solo (Legendre; Legendre, 2006). Essa análise foi realizada com base na matriz de Bray-Curtis e ajustada para minimizar o stress da representação gráfica dos dados, permitindo uma visualização otimizada das similaridades entre os locais amostrados.

Além da visualização dos padrões, foi aplicada a PERMANOVA (Análise de Variância Multivariada por Permutação) (Anderson, 2001) para testar se as diferenças na composição da comunidade entre os grupos de uso do solo (Floresta, Lavoura, Pecuária e Urbana) são estatisticamente significativas. Esse teste foi realizado considerando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e utilizando a função *adonis2()* do pacote *vegan*, com 999 permutações para garantir robustez estatística.

Para identificar quais grupos apresentaram diferenças significativas, foi realizada uma PERMANOVA pareada (*pairwise* PERMANOVA), utilizando a função *pairwise.adonis()*. Como a realização de múltiplas comparações pode aumentar o risco de erro Tipo I, os valores de p foram ajustados utilizando o método de Benjamini-Hochberg (BH), que controla a taxa de falsos descobrimentos (FDR) e reduz a chance de falsos negativos.

Para verificar se as diferenças detectadas pela PERMANOVA são atribuídas à composição da comunidade ou se foram influenciadas por variações na dispersão multivariada dentro de cada grupo, foi aplicado o teste de homogeneidade da dispersão beta (*Betadisper*) (Anderson, 2006). Esse método avalia se a variabilidade interna dos grupos é semelhante, garantindo que os resultados da PERMANOVA sejam estatisticamente robustos e não influenciados por diferenças na dispersão multivariada dos dados.

Todas as análises foram conduzidas no software R, utilizando os pacotes *vegan* e *pairwiseAdonis*.

5.7.5 Padrões de Associação entre a Comunidade e o Uso do Solo

Para avaliar a relação entre a composição da comunidade de peixes e os diferentes tipos de uso do solo, foram aplicadas duas abordagens complementares: a Análise de Valor Indicador (IndVal) e a Análise de Percentagem de Similaridade (SIMPER).

A Análise de Valor Indicador (IndVal) (Cáceres; Legendre, 2009; Dufrêne; Legendre, 1997), implementada pelo pacote *labdsv*, foi utilizada para identificar quais espécies nominais apresentam maior associação com cada categoria de uso do solo. Esse método permite determinar quais táxons ocorrem preferencialmente em determinados habitats ou grupos de amostras, podendo ser considerados indicadores dessas condições ambientais específicas. No procedimento, a matriz de abundância relativa (RRA) das MOTUs foi combinada com a variável categórica de uso do solo (Floresta, Lavoura, Pecuária, Urbana). Os resultados (valores indicativos e p-valores) foram extraídos e filtrados para reter apenas os táxons com $p < 0,05$, garantindo que somente associações estatisticamente significativas fossem consideradas.

Além disso, a Análise SIMPER (Similarity Percentage Analysis) (Clarke, 1993), realizada com o pacote *vegan*, foi empregada para quantificar a contribuição relativa de cada espécie nominal na dissimilaridade entre os grupos definidos pelo uso do solo. Esse método permite identificar quais espécies são mais determinantes nas diferenças estruturais da comunidade entre os diferentes tipos de ambiente analisados.

5.7.6 Influência das Variáveis Ambientais na Estrutura da Comunidade

Para compreender os fatores responsáveis pela variação na composição da ictiofauna entre os locais amostrados, foram analisadas variáveis ambientais locais e paisagísticas em relação à diversidade beta. Essas variáveis foram agrupadas em duas categorias principais:

- **Variáveis Locais:** características físicas do ambiente aquático no ponto de amostragem.

- **Variáveis Paisagísticas:** estrutura da bacia hidrográfica e o uso da terra em escalas espaciais maiores.

Para explorar os padrões nas variáveis ambientais antes das análises multivariadas, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA). O PCA permite reduzir a dimensionalidade dos dados ambientais e identificar os principais eixos de variação (Legendre; Legendre, 2006). Foram incluídas apenas variáveis contínuas na análise, enquanto variáveis categóricas (ex.: uso do solo, substrato e vegetação) foram tratadas separadamente no RDA. As análises foram realizadas no R (pacotes *vegan* e *stats*). Os primeiros componentes principais (PC1 e PC2) foram visualizados para avaliar agrupamentos e tendências ambientais entre os locais amostrados.

A Análise de Redundância (RDA) foi aplicada para avaliar a relação entre a composição da comunidade de peixes e as variáveis ambientais (Legendre; Legendre, 2006). A matriz de abundância relativa de reads (RRA) foi utilizada como variável resposta, enquanto as variáveis ambientais locais e paisagísticas foram consideradas como preditoras.

Para otimizar o modelo e evitar problemas de colinearidade, foi realizada uma seleção automática de variáveis por meio da função `ordiR2step()` (pacote *vegan*) (Blanchet; Legendre; Borcard, 2008). Esse procedimento foi conduzido utilizando um modelo nulo (sem preditores) e um modelo completo (com todas as variáveis ambientais), e a seleção foi baseada no critério de R^2 ajustado, garantindo que apenas as variáveis com maior contribuição preditiva fossem mantidas.

A significância do modelo final foi avaliada por meio de testes de permutação com 999 iterações (Borcard; Gillet; Legendre, 2018). Inicialmente, foi testada a significância global do modelo, comparando a variância explicada pelo modelo observado com uma distribuição nula gerada aleatoriamente. Em seguida, foi avaliada a significância dos eixos da RDA, identificando se cada eixo canônico explicava uma parcela estatisticamente relevante da variação na composição da comunidade. Por fim, foi testada a significância individual das variáveis ambientais, verificando quais variáveis selecionadas contribuíram significativamente para a estruturação da comunidade ictiofaunística.

Com esse procedimento, foi possível identificar os fatores ambientais mais relevantes para a variação na composição da ictiofauna e avaliar sua importância na estruturação das assembleias de peixes da Bacia do Rio Mundaú.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO E PROCESSAMENTO DE DADOS

O sequenciamento gerou um total de 3.468.152 reads brutos (raw data). Após o processamento bioinformático e filtragem de qualidade, foram obtidas 788 MOTUs, totalizando 232.601 reads. O sequenciamento dos controles negativos de extração e amplificação resultou na detecção de 22 MOTUs, totalizando 380 reads. Para garantir a confiabilidade dos dados, foram removidas as MOTUs cujas sequências coincidiam com aquelas detectadas nos controles negativos. Dentre essas 22 MOTUs, 5 apresentaram alta similaridade com MOTUs detectadas nos pontos de amostragem, correspondendo a um total de 267 reads. As MOTUs removidas incluíam:

- *Ceratoscopelus warmingii* (244 reads)
- *Canis lupus familiaris* (3 reads)
- *Homo sapiens* (6 reads)
- *Aequidens metae* (14 reads)

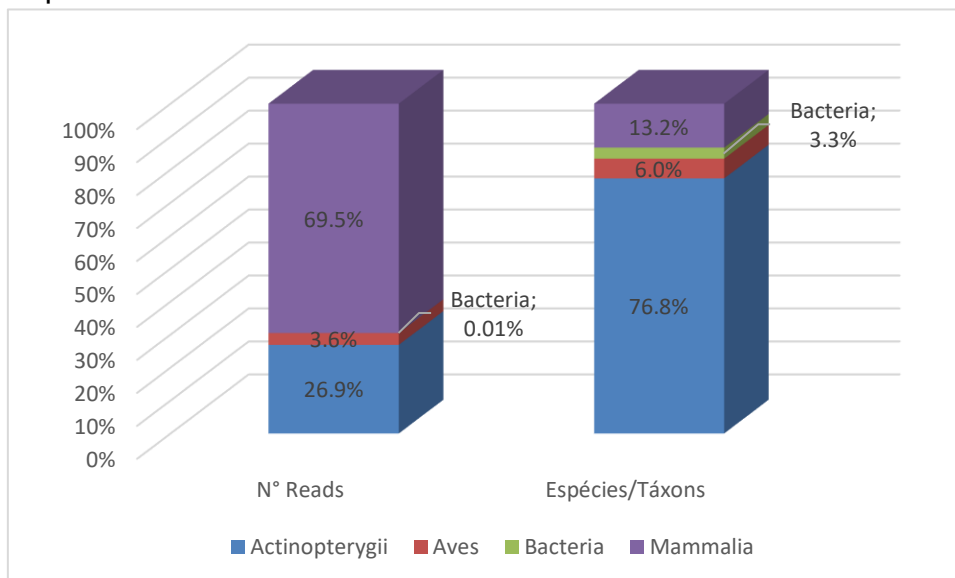
A exclusão dessas MOTUs foi realizada com base em dois critérios: (i) não pertencem ao grupo-alvo do estudo e (ii) no caso específico de *Aequidens metae*, a espécie não possui registros para o Brasil, sugerindo possível contaminação ou erro na atribuição taxonômica. Diante disso, optou-se por removê-las completamente da análise.

Após a atribuição taxonômica, a aplicação dos filtros de similaridade ($\geq 90\%$) e cobertura mínima ($\geq 85\%$), bem como o processo de reclusterização para remoção de MOTUs redundantes entre estações (utilizando corte de 98% de similaridade), foram retidos 213.217 reads, agrupados em 280 MOTUs não redundantes, que resultaram na identificação de 150 registros taxonômicos distintos (Tabela 3; Figura 6).

Tabela 3 - Número de Reads, MOTUs e Diversidade Taxonômica nos Grupos Identificados

Classe	N° Reads totais	MOTUs	Ordens	Famílias	Gêneros	Espécies / Táxons
Actinopterygii	57 286	172	24	53	80	116
Aves	7 667	18	5	7	8	9
Bacteria	17	5	4	3	5	5
Mammalia	148 247	85	6	11	17	20
Total geral	213 217	280	39	74	110	150

Figura 6 - Relação entre Número de Reads e Diversidade de Espécies/Táxons nominais nas Classes Identificadas



Como parte do processo de filtragem, foram removidas as MOTUs pertencentes a Mammalia, Aves e Bacteria, mantendo apenas aquelas correspondentes a peixes ósseos (Actinopterygii), que constituem o grupo-alvo deste estudo. Após essa etapa, a base de dados passou a conter 57.286 reads, distribuídos em 172 MOTUs, das quais 116 táxons foram identificados, abrangendo espécies de água doce, estuarinas e marinhas.

Entretanto, duas MOTUs foram excluídas da análise principal por corresponderem a espécies com alta similaridade a registros de peixes não nativos da América do Sul, identificadas como *Rubricatichromis cerasogaster* (reportado para a África Ocidental e Central) e *Alburnus alburnus* (com distribuição na Eurásia). Embora a ausência de sequências de referência específicas para a ictiofauna do Mundaú limite uma confirmação definitiva, a atribuição dessas MOTUs a espécies geograficamente distantes, sem registros conhecidos para a América do Sul em bases como IUCN, GBIF e Eschmeyer's Catalog of Fishes, sugere que sua detecção pode ter sido resultado de uma contaminação externa.

Os números finais apresentados na Tabela 4 refletem apenas os táxons compatíveis com os critérios de curadoria adotados neste estudo, detalhando a distribuição das MOTUs por nível taxonômico e ambiente de ocorrência.

Tabela 4 - Distribuição de MOTUs e Reads de Peixes de Água Doce e Marinhos por Critério de Similaridade

Grupo	Critério de Similaridade	Número de MOTUs	Número de Espécies nominais/Táxons	Número de Reads
Peixes de água doce - nível de espécie	≥ 97%	41	38	32.940
Peixes de água doce - nível de gênero	95 - 97%	10	10	3.839
Peixes de água doce - nível de família/ordem	90 - 95%	8	8	730
Peixes marinhos e estuarinos - total	≥ 90%	113	60	19.777

No processo de atribuição taxonômica, observou-se que 32.940 leituras (58,8%) foram identificadas até o nível de espécie, representando 38 espécies nominais distribuídas em 41 MOTUs com similaridade igual ou superior a 97%. Por outro lado, 3.839 leituras (6,8%) foram atribuídas apenas ao nível de gênero, correspondendo a 10 MOTUs com similaridade entre 95% e 97%, enquanto 730 leituras (1,3%) foram classificadas em níveis taxonômicos superiores (família ou ordem), pois apresentaram similaridade entre 90% e 95%. Além disso, foram detectadas 19.777 leituras (35,3%) associadas a peixes marinhos e estuarinos, agrupadas em 113 MOTUs atribuídas a 60 táxons.

A alta proporção de MOTUs identificadas como pertencentes a táxons marinhos e estuarinos levantou um ponto crítico para a interpretação dos dados. Essas detecções ocorreram em áreas de água doce, onde a presença desses táxons não era esperada, sugerindo possíveis fontes de contaminação ambiental ou transporte passivo de DNA. Para garantir a robustez das análises, foram consideradas apenas as MOTUs identificadas como peixes de água doce, mantendo exclusivamente aquelas classificadas em nível de espécie com ≥ 97% de similaridade.

Entretanto, duas MOTUs do grupo de peixes de água doce (*Salmo salar* e *Clarias gariepinus*) foram retiradas da matriz de dados, pois não possuem registros de ocorrência na ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE). Por se tratarem de espécies exóticas, amplamente utilizadas na aquicultura e no consumo humano, é muito provável que representem rastros de material genético liberado no ambiente a partir do processamento, descarte ou consumo desses organismos, e não indivíduos

pertencentes à fauna local. Dessa forma, essas MOTUs foram consideradas contaminantes derivados de atividades antrópicas e removidas da análise.

Como etapa final na construção da matriz de abundância relativa, os resultados das subamostras foram agrupados, gerando um único conjunto de dados para cada ponto de amostragem. Além disso, para as análises de diversidade e ecológicas, a unidade de investigação considerada foi a espécie nominal, em vez de MOTUs individuais.

Dessa forma, os reads atribuídos a diferentes MOTUs de uma mesma espécie foram consolidados, permitindo o cálculo da abundância relativa de reads (RRA) para cada espécie nominal.

Após a aplicação dos critérios de curadoria, a matriz final de dados passou a conter 32.401 reads e 39 MOTUs atribuídas a 36 espécies nominais ou táxons, pertencentes a 6 ordens de peixes (Characiformes, Cichliformes, Cyprinodontiformes, Gymnotiformes, Siluriformes e Synbranchiformes). Dentre essas, 2 táxons foram classificados como exóticos, os ciclídeos *Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli*. A Tabela 5 apresenta a lista de táxons identificados por eDNA metabarcoding na Bacia do Rio Mundaú, incluindo a distribuição das MOTUs consolidadas em nível de espécie nominal e sua respectiva abundância de reads.

Dos 36 táxons identificados, apenas 9 (25%) puderam ser atribuídos com segurança até o nível de espécie, dos quais 2 correspondem a espécies exóticas. As demais MOTUs foram classificadas até os níveis de gênero ou família, ou atribuídas como táxons indeterminados, devido principalmente à ausência de sequências de referência para várias espécies da ictiofauna regional nas bases GenBank, e à baixa cobertura ou à elevada divergência observada em relação às sequências disponíveis.

A partir dos dados resultantes após a aplicação dos filtros e da reclusterização, observou-se que a maioria dos táxons foi representada por uma única MOTU. Apenas dois táxons apresentaram múltiplas MOTUs: *Oreochromis niloticus*, com três MOTUs, e *Rhamdia quelen*, com duas MOTUs

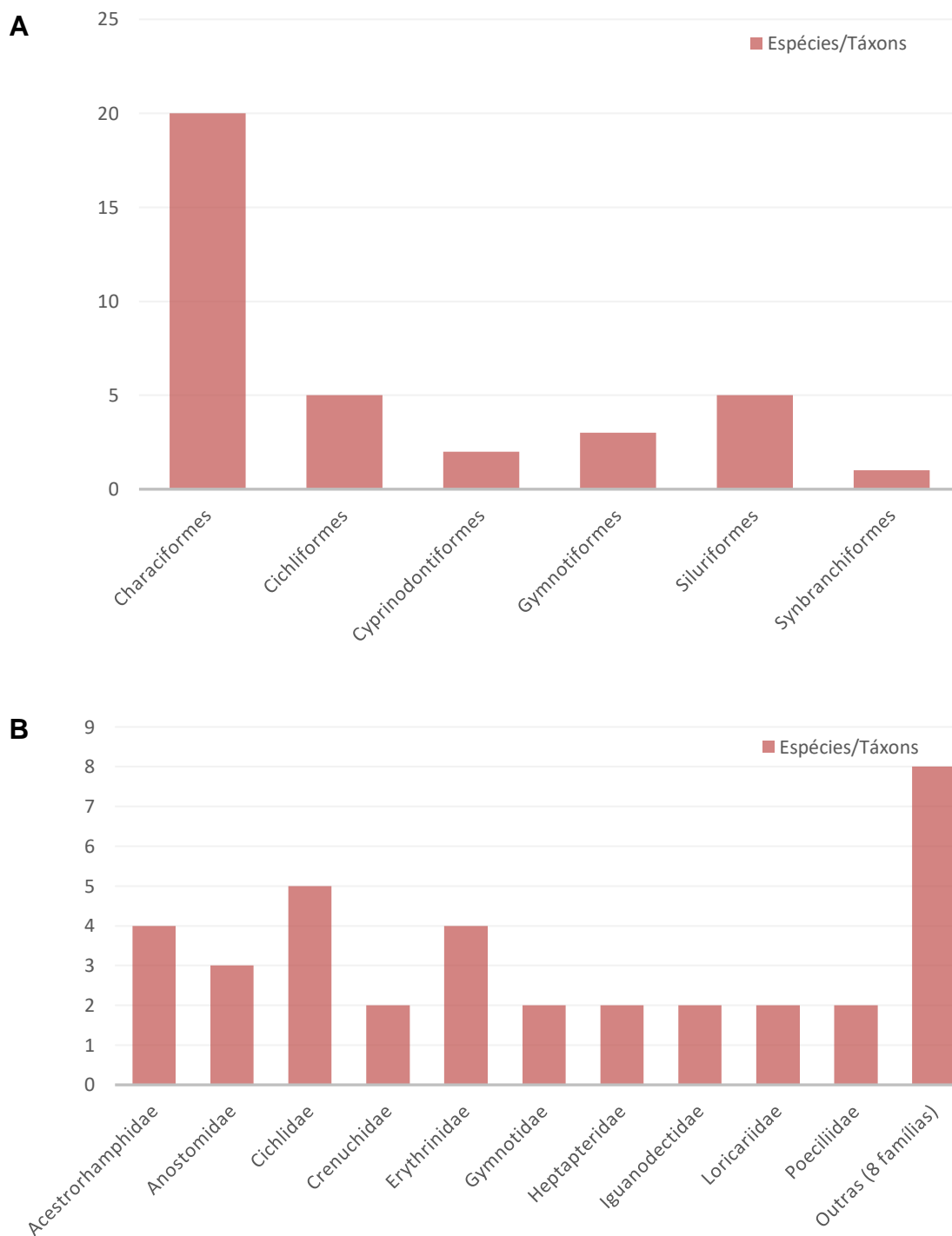
Tabela 5 - Lista de táxons identificados por eDNA metabarcoding na Bacia do Rio Mundaú

Táxons	NºReads	NºMOTUs
CHARACIFORMES		
Acestrorhamphidae		
<i>Astyanax sp. 1</i>	3080	1
<i>Astyanax sp. 2</i>	400	1
<i>Hemigrammus sp.</i>	11	1
<i>Hyphessobrycon sp. 1</i>	97	1
Acestrorhynchidae		
<i>Acestrorhynchus sp.</i>	48	1
Anostomidae		
<i>Anostomidae sp.</i>	15	1
<i>Leporinus sp.</i>	322	1
<i>Leporinus sp. 2</i>	159	1
Characidae		
<i>Serrapinnus heterodon</i>	6	1
Crenuchidae		
<i>Characidium sp. (bimaculatum?)</i>	135	1
<i>Characidium sp. 2 (bimaculatum?)</i>	233	1
Erythrinidae		
<i>Erythrinus erythrinus</i>	57	1
<i>Hoplias sp. 1</i>	225	1
<i>Hoplias sp. 2</i>	4372	1
<i>Hoplias sp. 3</i>	98	1
Iguanodectidae		
<i>Bryconops sp. 1</i>	69	1
<i>Bryconops sp. 2</i>	46	1
Lebiasinidae		
<i>Nannostomus sp. (beckfordi?)</i>	165	1
Prochilodontidae		
<i>Prochilodus sp. (brevis?)</i>	30	1
Serrasalminidae		
<i>Pygocentrus nattereri</i>	30	1
CICHLIFORMES		
Cichlidae		
<i>Australoheros sp.</i>	11531	1
<i>Cichlidae sp.</i>	294	1
<i>Geophagus brasiliensis</i>	1090	1
CYPRINODONTIFORMES		
Poeciliidae		
<i>Poecilia sp. 1</i>	48	1
<i>Poecilia sp. 2</i>	374	1
GYMNOTIFORMES		
Gymnotidae		
<i>Gymnotus carapo</i>	2095	1
<i>Gymnotus sp.</i>	20	1
Sternopygidae		
<i>Eigenmannia sp.</i>	77	1
SILURIFORMES		
Callichthyidae		
<i>Callichthys callichthys</i>	25	1
Heptapteridae		
<i>Pimelodella sp.</i>	22	1
<i>Rhamdia quelen</i>	447	2
Loricariidae		
<i>Hypostomus sp. 1</i>	73	1
<i>Hypostomus sp. 2</i>	35	1
SYNBRANCHIFORMES		
Synbranchidae		
<i>Synbranchus sp.</i>	173	1
<hr/>		
Espécies exóticas invasoras		
CICHLIFORMES		
Cichlidae		
<i>Coptodon rendalli</i>	2725	1
<i>Oreochromis niloticus</i>	3774	3
Total general	32401	39

A Figura 7 apresenta a composição taxonômica da ictiofauna detectada por meio de eDNA na bacia do rio Mundaú, organizada por ordem (A) e família (B). Observa-se que as ordens Characiformes, Siluriformes e Cichliformes concentraram a maior

riqueza taxonômica, seguidas por Gymnotiformes e Cyprinodontiformes. No nível de família, destacam-se Cichlidae, Acestrorhamphidae e Erythrinidae.

Figura 7 - Distribuição taxonômica das espécies nominais e táxons por Ordem (A) e Família (B).

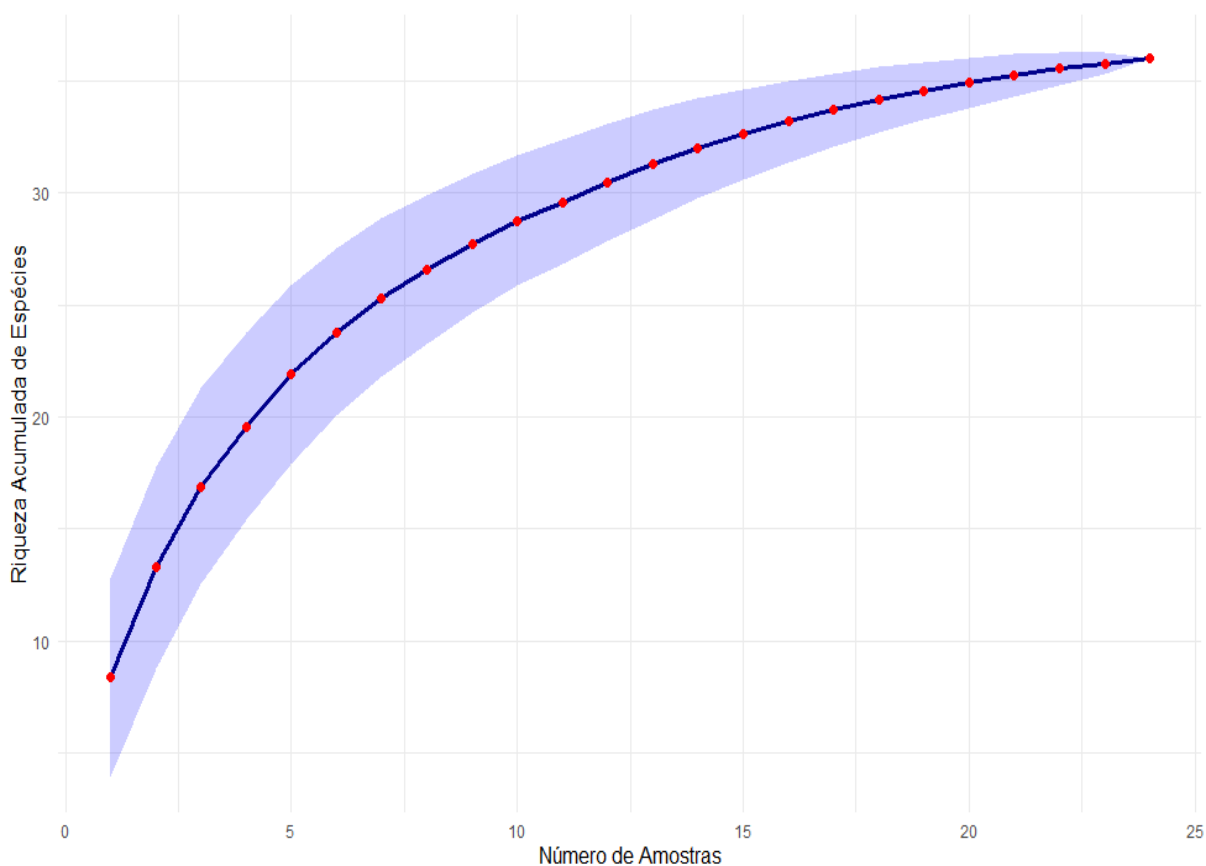


6.2 CURVA DE ACUMULAÇÃO DE ESPÉCIES

A curva de acumulação de espécies nominais (Figura 8) indicou um aumento progressivo na riqueza acumulada à medida que novas amostras foram adicionadas, atingindo um total de 36 espécies detectadas. A taxa de descoberta de novas espécies foi inicialmente alta, com 50% da riqueza total sendo alcançada com apenas 4 amostras e 75% da riqueza sendo atingida com 9 amostras.

No entanto, essa taxa de descoberta reduziu progressivamente nas amostras subsequentes. Nas últimas 10 amostras, foram detectadas apenas 4,01 novas espécies, e nas últimas 5 amostras esse valor caiu para 1,44 espécies. Esse padrão indica que, embora a curva ainda apresente um leve crescimento, a taxa de acumulação está claramente desacelerando e tende a um platô.

Figura 8 - Curva de Acumulação de Espécies nominais gerada pelo Método de Permutação Aleatória (1000 permutações).



6.3 DIVERSIDADE ALFA NOS PONTOS DE AMOSTRAGEM

A diversidade dentro de cada ponto amostral foi analisada por meio dos índices de riqueza de espécies nominais (Sobs), Shannon-Wiener (H'), Simpson (1-D) e Pielou (J'). A riqueza de espécies nominais variou consideravelmente entre os pontos, com valores mínimos de 2 espécies nominais (P3, U2 e U4) e um valor máximo de 17 espécies nominais (P1). Os valores detalhados dos índices de diversidade alfa para cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 6 e ilustrados na Figura 9.

Tabela 6 - Diversidade Alfa por Ponto de Amostragem

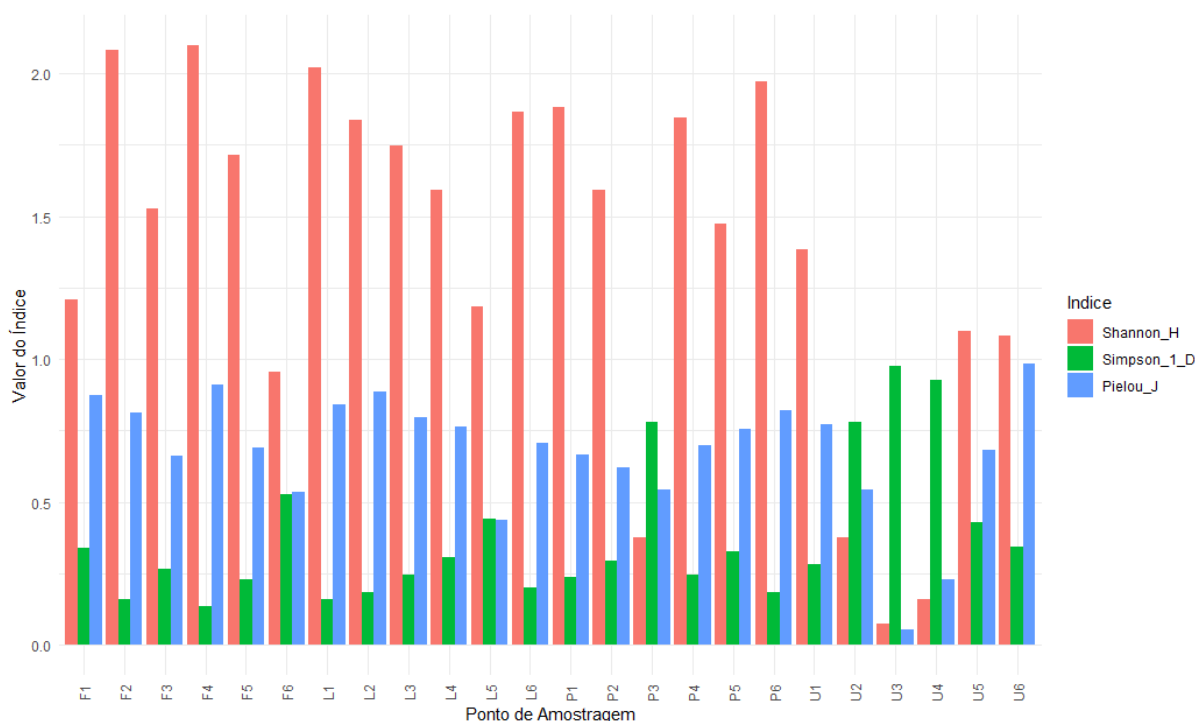
Ponto	Uso do Solo	Riqueza (Sobs)	Shannon (H)	Simpson (1-D)	Pielou (J)
F1	Floresta	4	1,210	0,340	0,873
F2	Floresta	13	2,082	0,160	0,812
F3	Floresta	10	1,526	0,265	0,663
F4	Floresta	10	2,099	0,135	0,912
F5	Floresta	12	1,715	0,229	0,690
F6	Floresta	6	0,957	0,527	0,534
L1	Lavoura	11	2,022	0,159	0,843
L2	Lavoura	8	1,839	0,183	0,884
L3	Lavoura	9	1,748	0,246	0,796
L4	Lavoura	8	1,591	0,307	0,765
L5	Lavoura	15	1,184	0,440	0,437
L6	Lavoura	14	1,865	0,202	0,707
P1	Pecuária	17	1,884	0,238	0,665
P2	Pecuária	13	1,591	0,296	0,620
P3	Pecuária	2	0,377	0,781	0,544
P4	Pecuária	14	1,847	0,244	0,700
P5	Pecuária	7	1,472	0,328	0,756
P6	Pecuária	11	1,972	0,186	0,822
U1	Urbana	6	1,386	0,284	0,773
U2	Urbana	2	0,377	0,781	0,544
U3	Urbana	4	0,076	0,975	0,054
U4	Urbana	2	0,158	0,929	0,229
U5	Urbana	5	1,100	0,431	0,684
U6	Urbana	3	1,082	0,344	0,985

O índice de Shannon-Wiener (H') apresentou valores entre 0,076 (U3), indicando uma comunidade altamente dominada por poucos táxons, e 2,099 (F4), que reflete uma comunidade com maior diversidade e distribuição mais equilibrada das abundâncias.

O índice de Simpson (1-D) variou de 0,135 (F4) a 0,975 (U3), sugerindo que alguns pontos apresentaram alta dominância de poucos táxons (valores mais baixos) enquanto outros foram caracterizados por maior equitabilidade (valores mais altos).

De forma semelhante, o índice de equitabilidade de Pielou (J') variou de 0,054 (U3) a 0,985 (U6), evidenciando que, nos locais com maiores valores, a distribuição das abundâncias foi mais homogênea entre as espécies, enquanto nos pontos com valores mais baixos houve maior desigualdade na contribuição dos táxons para a comunidade.

Figura 9 - Comparação dos Índices de Diversidade Alfa



A análise dos índices de diversidade por categoria de uso do solo revelou padrões claros e consistentes. O boxplot do índice de Shannon-Wiener (Figura 10) mostra que os valores mais altos de diversidade foram registrados nas áreas de lavoura, pecuária e floresta, que apresentaram medianas elevadas e variação relativamente baixa. Por outro lado, os pontos localizados em áreas urbanas exibiram os menores valores de diversidade e uma maior dispersão dos valores do índice.

Além disso, a comparação dos índices de Pielou e Simpson (Figura 11) evidencia que a equitabilidade e a dominância das espécies também variaram conforme o uso do solo. As áreas de floresta e lavoura apresentaram valores medianos de equitabilidade (Pielou) relativamente altos, indicando comunidades mais equilibradas em termos de abundância relativa dos táxons. Em contraste, as áreas urbanas se destacaram pelos maiores valores de dominância (índice de Simpson),

refletindo a presença de táxons altamente dominantes, além de apresentarem alta variabilidade na equitabilidade.

Figura 10 - Distribuição do Índice de Shannon-H por Uso do Solo

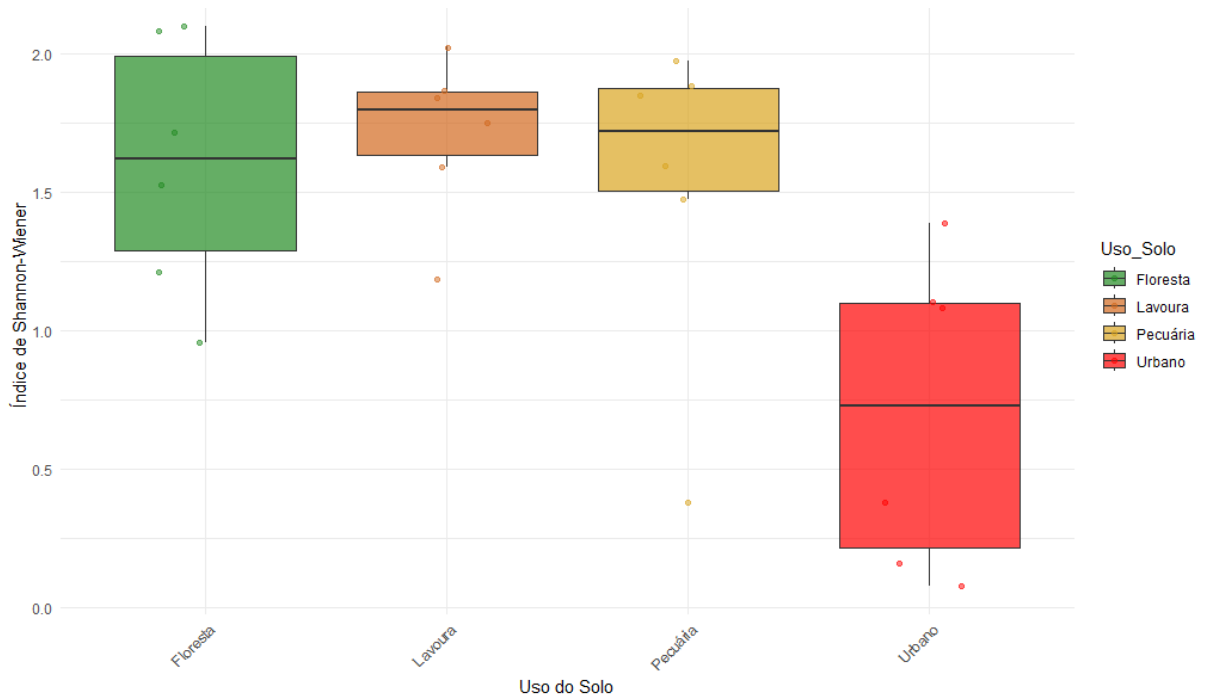
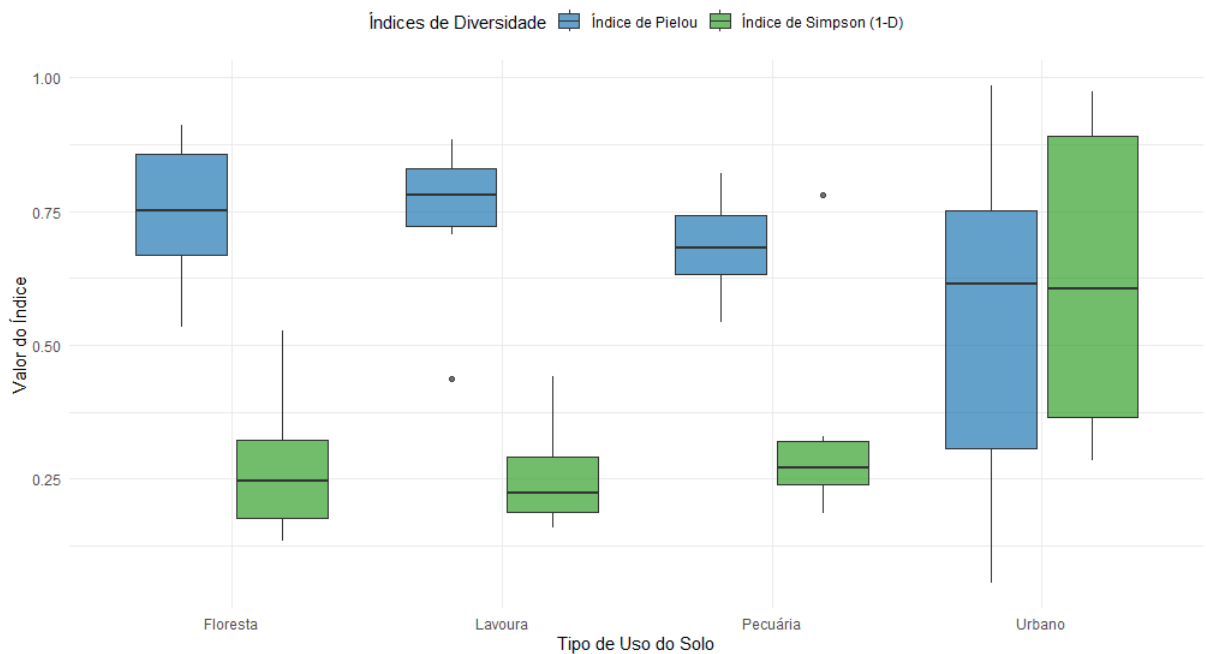


Figura 11 - Comparação dos Índices de Pielou e Simpson por Tipo de Uso do Solo



Esses resultados indicam que a diversidade alfa foi substancialmente influenciada pelo tipo de uso do solo. De maneira geral, as áreas de floresta, lavoura e pecuária sustentaram comunidades mais diversas e relativamente equilibradas, enquanto os ambientes urbanos apresentaram não apenas menor diversidade, mas também maior variação nos índices de dominância e equitabilidade.

6.4 COMPARAÇÃO ENTRE ÁREAS COM DIFERENTES TIPOS DE USO DA TERRA

Para avaliar se as diferenças nos índices de diversidade observadas entre os tipos de uso do solo (Floresta, Lavoura, Pecuária e Urbana) são estatisticamente significativas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. O resultado indicou uma diferença significativa na diversidade de Shannon-Wiener entre os grupos ($\chi^2 = 9,3224$; $df = 3$; $p = 0,0253$), sugerindo que pelo menos um dos tipos de uso do solo apresenta uma diversidade significativamente distinta dos demais (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis

Estatística de Teste	Valor χ^2	Graus de Liberdade	Valor p
Kruskal-Wallis χ^2	9,3224	3	0,0253

Dado o resultado significativo do teste de Kruskal-Wallis, aplicou-se um teste post-hoc de Mann-Whitney com correção de Benjamini-Hochberg (BH) para determinar quais pares de grupos apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tabela 8).

Tabela 8 - Teste Post-Hoc de Mann-Whitney com Correção de Benjamini-Hochberg (BH).

Comparação	Valor p	Valor p ajustado (BH)	Significância
Floresta vs. Lavoura	0,810	0,936	Não significativa
Floresta vs. Pecuária	0,936	0,936	Não significativa
Floresta vs. Urbana	0,031	0,061	Tendência à significância
Lavoura vs. Pecuária	0,936	0,936	Não significativa
Lavoura vs. Urbana	0,008	0,049	Significativa
Pecuária vs. Urbana	0,025	0,061	Tendência à significância

Os resultados indicaram que apenas a comparação entre as áreas de Lavoura e Urbana apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,049$), enquanto as demais comparações não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Esse padrão é consistente com os resultados gráficos apresentados na Figura 10, onde os pontos amostrais em ambientes urbanos mostraram valores medianos mais baixos e maior dispersão no índice de Shannon, enquanto as áreas de Lavoura, Pecuária e Floresta apresentaram maior consistência nos valores de diversidade.

6.5 DIVERSIDADE BETA E ESTRUTURA DA COMUNIDADE

A variação na composição da ictiofauna entre os diferentes tipos de uso do solo foi analisada por meio da Análise de Escalonamento Não Métrico (NMDS) e da PERMANOVA, ambas baseadas na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis.

Figura 12 - NMDS representando a variação na composição da comunidade de peixes entre os diferentes usos do solo.



A NMDS apresentou um stress de 0,161, indicando um ajuste aceitável para a representação bidimensional das relações entre as comunidades (Figura 12). O gráfico revela uma sobreposição parcial entre os diferentes tipos de uso do solo, sugerindo que há similaridade na composição da ictiofauna entre alguns ambientes. Enquanto Pecuária e Lavoura apresentaram maior proximidade na distribuição dos

pontos, Floresta e Urbano mostraram maior dispersão, indicando variação mais acentuada na estrutura das comunidades nesses ambientes.

Para avaliar se as diferenças na composição da comunidade ictiofaunística entre os diferentes tipos de uso do solo (Floresta, Lavoura, Pecuária e Urbana) são estatisticamente significativas, foi realizada uma Análise de Variância Multivariada por Permutação (PERMANOVA). Os resultados indicaram que não houve efeito estatisticamente significativo do uso do solo sobre a composição das assembleias ($F = 1,39$; $R^2 = 0,172$; $p = 0,096$; Tabela 9), embora o valor de p marginal ($p < 0,10$) sugira uma tendência de variação associada ao uso do solo. Nesse modelo, aproximadamente 17,2% da variação na composição da comunidade é explicada pelo uso do solo.

Tabela 9 - Resultados da PERMANOVA baseada no índice de Bray-Curtis.

Fonte	Df	Soma de Quadrados	R ²	F	p-valor
Uso do Solo	3	1,2945	0,1723	1,3873	0,096
Resíduo	20	6,2205	0,8277	-	-
Total	23	7,5150	1,0000	-	-

Tabela 10 - Comparação pareada da composição da comunidade (PERMANOVA).

Comparação	Df	Soma de Quadrados	F.Model	R ²	p-valor	p ajustado (BH)	Significância
Floresta vs. Lavoura	1	0,2248	0,7493	0,0697	0,677	0,677	Não significativa
Floresta vs. Pecuária	1	0,3770	1,2410	0,1104	0,286	0,429	Não significativa
Floresta vs. Urbano	1	0,6962	1,9817	0,1654	0,071	0,297	Não significativa
Lavoura vs. Pecuária	1	0,2234	0,8250	0,0762	0,618	0,677	Não significativa
Lavoura vs. Urbano	1	0,5799	1,8219	0,1541	0,099	0,297	Não significativa
Pecuária vs. Urbano	1	0,4878	1,5147	0,1315	0,159	0,318	Não significativa

A análise pareada da PERMANOVA (Tabela 10) não revelou diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos pares de grupos após o ajuste de

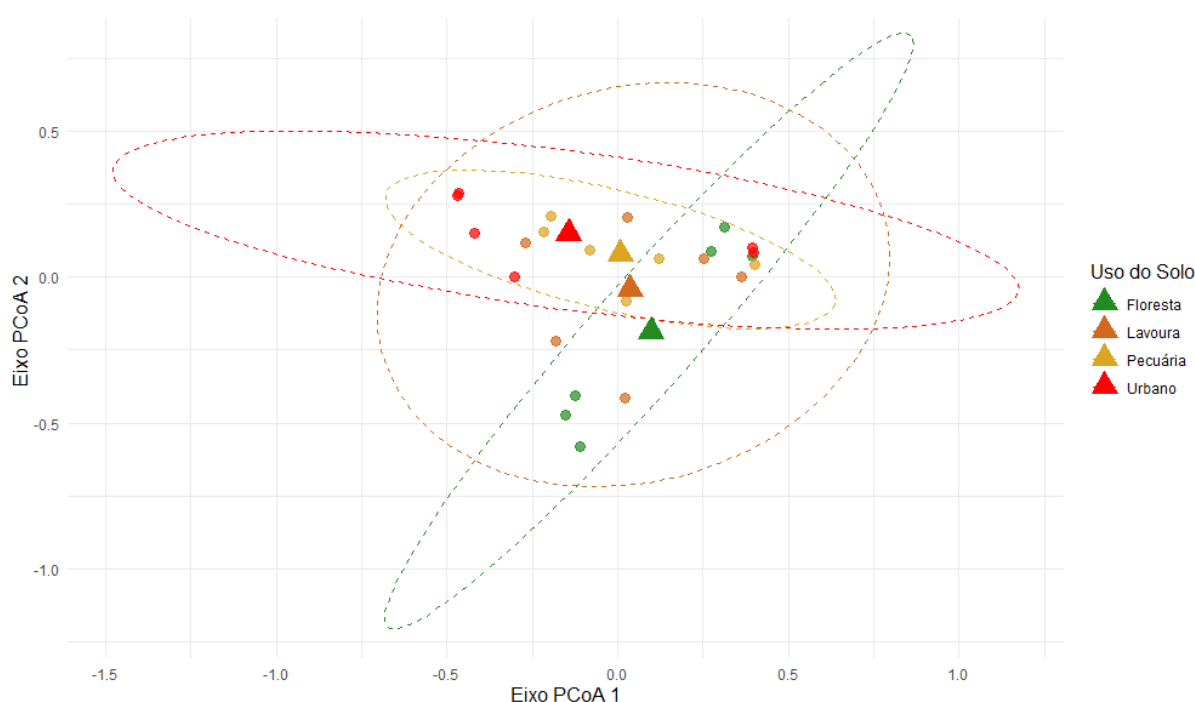
Benjamini-Hochberg (todos p ajustados $> 0,26$). As comparações com valores não ajustados indicaram tendências à diferenciação principalmente entre Floresta vs. Urbano ($p = 0,071$) e Lavoura vs. Urbano ($p = 0,099$), sugerindo certa diferenciação da ictiofauna associada aos ambientes urbanos, embora não significativa.

Para verificar se as diferenças observadas poderiam ser atribuídas à heterogeneidade da dispersão beta, foi realizado um teste de homogeneidade (Betadisper). Os resultados não indicaram diferença significativa na dispersão das amostras entre os grupos ($F = 0,75$; $p = 0,54$; Tabela 11; Figura 13). Isso sugere que a variação detectada na PERMANOVA, embora não seja significativa, não é resultado de diferenças na variabilidade interna dos grupos, e sim de diferenças na composição média das comunidades.

Tabela 11 - Teste de Permutação para Homogeneidade da Dispersão Beta (Betadisper)

Df	Sum Sq	Mean Sq	F	N.Perm	Pr(>F)
3	0,03412	0,011373	0,745412	999	0,537629
20	0,305157	0,015258			

Figura 13 - Representação Gráfica da Homogeneidade da Dispersão Beta por Tipo de Uso do Solo



6.6 PADRÕES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A COMUNIDADE E O USO DO SOLO

A análise de Valor Indicador (IndVal) revelou a presença de três táxons com associação significativa a categorias específicas de uso do solo (Tabela 12). A espécie *Callichthys callichthys* foi identificada como indicadora de áreas de pecuária, apresentando um valor de IndVal de 0,542 ($p = 0,029$), indicando alta fidelidade e especificidade para este tipo de ambiente. De forma semelhante, *Poecilia sp. 1* também foi fortemente associada às áreas de pecuária, com um valor de IndVal de 0,500 ($p = 0,041$). Por outro lado, a espécie exótica *Oreochromis niloticus* foi associada a ambientes urbanos, com um valor de IndVal de 0,572 ($p = 0,055$)

Nenhum táxon apresentou valores indicativos relevantes para os ambientes de floresta ou lavoura, sugerindo que a composição de espécies nesses ambientes é mais compartilhada ou que a ocorrência das espécies, neste contexto, é menos restrita a esses usos específicos do solo.

Tabela 12 - Resultados da Análise de Valor Indicador (IndVal) para os Diferentes Usos do Solo.

MOTU	IndVal Floresta	IndVal Lavoura	IndVal Pecuária	IndVal Urbano	p-value
<i>Callichthys callichthys</i>	0,031	0,000	0,542	0,000	0,029
<i>Oreochromis niloticus</i>	0,000	0,151	0,054	0,572	0,055
<i>Poecilia sp. 1</i>	0,000	0,000	0,500	0,000	0,041

A análise SIMPER identificou os táxons que mais contribuíram para a dissimilaridade entre os grupos de uso do solo (Tabela 13). Na comparação entre áreas de floresta e lavoura, a maior contribuição foi de *Coptodon rendalli*, responsável por 12,22% da dissimilaridade, seguido por *Cichlidae sp.* (6,35%) e *Australoheros sp.* (6,28%).

Entre floresta e pecuária, os principais contribuintes foram *Coptodon rendalli* (12,29%), *Hoplias sp. 2*, com uma contribuição significativa de 10,20% ($p = 0,050$), e *Poecilia sp. 1*, também significativa, com 7,36% ($p = 0,004$).

Tabela 13 - Resultados da Análise SIMPER para a Dissimilaridade entre os Usos do Solo.

Contraste	Espécie Principal	Contribuição Média (%)	p-valor
Floresta vs. Lavoura	<i>Coptodon rendalli</i>	12,22	0,745
	<i>Cichlidae sp.</i>	6,35	0,111
	<i>Australoheros sp.</i>	6,28	0,400
Floresta vs. Pecuária	<i>Coptodon rendalli</i>	12,29	0,707
	<i>Hoplias sp. 2</i>	10,20	0,050*
	<i>Poecilia sp. 1</i>	7,36	0,004*
Floresta vs. Urbano	<i>Coptodon rendalli</i>	17,58	0,099
	<i>Oreochromis niloticus</i>	15,56	0,016*
	<i>Poecilia sp. 2</i>	7,35	0,367
Lavoura vs. Pecuária	<i>Hoplias sp. 2</i>	9,72	0,098
	<i>Coptodon rendalli</i>	8,57	0,952
	<i>Poecilia sp. 1</i>	7,36	0,006*
Lavoura vs. Urbano	<i>Coptodon rendalli</i>	16,20	0,242
	<i>Oreochromis niloticus</i>	14,49	0,058
	<i>Poecilia sp. 2</i>	7,29	0,478
Pecuária vs. Urbano	<i>Coptodon rendalli</i>	16,21	0,255
	<i>Oreochromis niloticus</i>	15,52	0,15*
	<i>Hoplias sp. 2</i>	10,47	0,39*

Na comparação entre floresta e urbano, *Coptodon rendalli* se destacou com uma contribuição de 17,58%, seguido por *Oreochromis niloticus*, que apresentou uma contribuição significativa de 15,56% ($p = 0,016$), enquanto *Poecilia sp. 2* contribuiu com 7,35%, sem significância estatística.

Na comparação entre lavoura e pecuária, *Hoplias sp. 2* foi o principal contribuinte, com 9,72% ($p = 0,098$), acompanhado por *Coptodon rendalli* (8,57%) e novamente *Poecilia sp. 1*, com contribuição significativa de 7,36% ($p = 0,006$).

Quando comparadas as áreas de lavoura e urbano, as maiores contribuições vieram de *Coptodon rendalli* (16,20%) e *Oreochromis niloticus* (14,49%), que apresentou uma tendência à significância ($p = 0,058$), além de *Poecilia sp. 2* (7,29%), sem diferença significativa.

Por fim, na comparação entre pecuária e urbano, os principais táxons foram *Coptodon rendalli* (16,21%), *Oreochromis niloticus*, com contribuição significativa de 15,52% ($p = 0,015$), e *Hoplias sp. 2*, também com contribuição significativa de 10,47% ($p = 0,039$).

6.7 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS AMBIENTAIS NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE

6.7.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para identificar os principais eixos de variação das variáveis ambientais e paisagísticas associadas aos pontos de amostragem. Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicaram juntos 45,22% da variância total dos dados, com o primeiro componente (PC1) sendo responsável por 25,64% e o segundo (PC2) por 19,58% da variação observada (Tabela 14).

Tabela 14 - Importância dos Componentes Principais

Componente	Desvio Padrão	Variância Explicada (%)	Variância Acumulada (%)
PC1	1,9610	25,64	25,64
PC2	1,7138	19,58	45,22
PC3	1,6036	17,14	62,36
PC4	1,5035	15,07	77,43
PC5	1,0532	7,40	84,83
PC6	0,8658	5,00	89,82

Os coeficientes de carga das variáveis ambientais nos componentes principais indicam o grau de influência de cada variável na variação explicada pelos eixos PC1 e PC2 (Tabela 15). Valores mais elevados, sejam positivos ou negativos, refletem maior contribuição da variável para a diferenciação das amostras no espaço multivariado

O primeiro componente principal (PC1) representou variações associadas a características hidrológicas locais. Variáveis como Profundidade Média (-0.391, profundidade média do canal), *Profundidade_DesvioP* (-0.346, variação da profundidade dentro do ponto de amostragem), *Vazão* (-0.275) e *Largura Média* (-0.286, largura média do canal) apresentaram cargas negativas elevadas, indicando que menores valores de PC1 estão associados a locais com maior profundidade, maior vazão e canais fluviais mais largos. Por outro lado, variáveis como *Altura* (0.321, altitude do ponto amostral) e *Floresta_Drenagem* (0.134, porcentagem de cobertura florestal na área de drenagem) apresentaram cargas positivas, indicando que valores

altos de PC1 correspondem a áreas mais elevadas e com maior cobertura florestal na área de drenagem

Tabela 15 - Cargas das Variáveis nos Primeiros Componentes da PCA

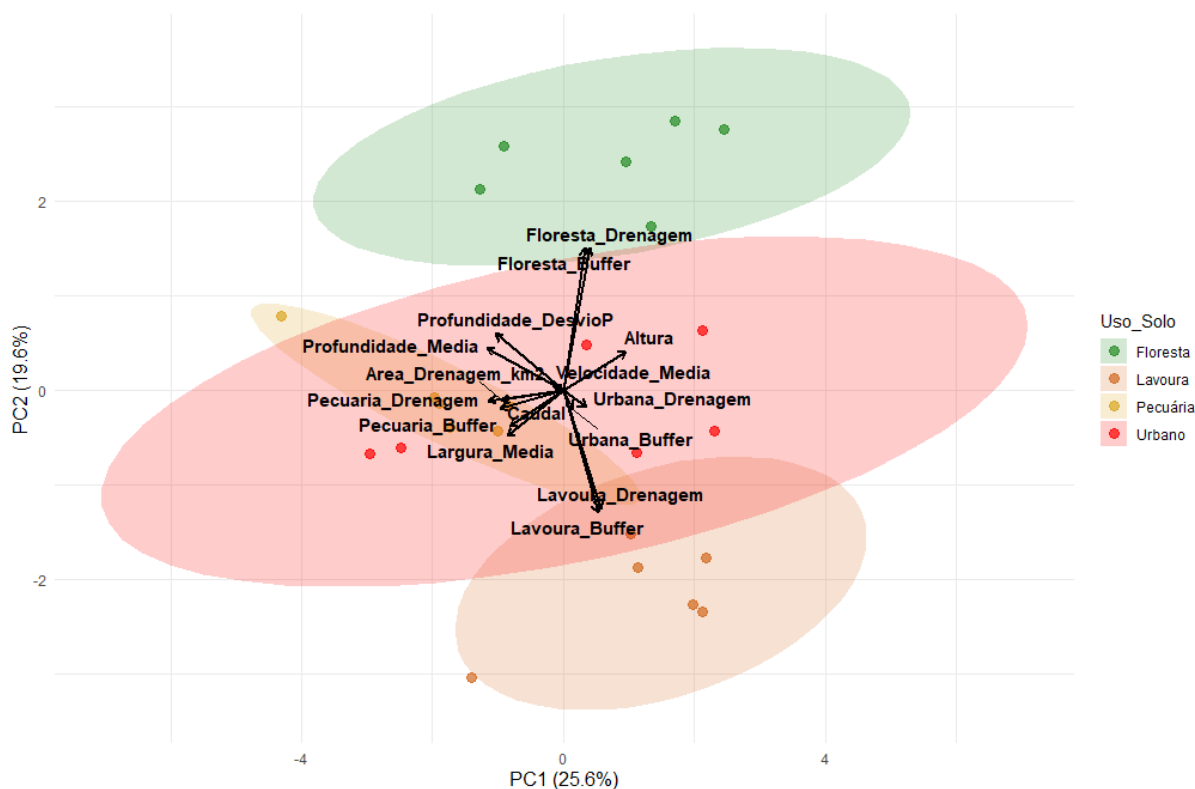
Variável	PC1	PC2
Vazão	-0,275	-0,128
Velocidade_Media	-0,052	0,016
Profundidade_Media	-0,391	0,150
Profundidade_DesvioP	-0,346	0,201
Largura_Media	-0,286	-0,159
Altura	0,321	0,137
Area_Drenagem_km2	-0,313	-0,035
Floresta_Buffer	0,112	0,502
Lavoura_Buffer	0,176	-0,429
Pecuaria_Buffer	-0,322	-0,064
Urbana_Buffer	0,050	-0,067
Floresta_Drenagem	0,134	0,503
Lavoura_Drenagem	0,190	-0,415
Pecuaria_Drenagem	-0,386	-0,035
Urbana_Drenagem	0,115	-0,060

. O segundo componente principal (PC2) refletiu gradientes de uso do solo, sendo fortemente influenciado por variáveis que descrevem a cobertura da paisagem. *Floresta_Buffer* (0.502, porcentagem de cobertura florestal dentro do buffer de 1 km ao redor do ponto) e *Floresta_Drenagem* (0.503, porcentagem de cobertura florestal na área de drenagem) apresentaram cargas positivas elevadas, indicando que amostras com altos valores de PC2 estão associadas a áreas com maior cobertura florestal. Em contraste, *Lavoura_Buffer* (-0.429, porcentagem de área agrícola dentro do buffer de 1 km) e *Lavoura_Drenagem* (-0.415, porcentagem de área agrícola na área de drenagem) apresentaram cargas negativas, sugerindo que amostras com valores mais baixos de PC2 estão relacionadas a áreas agrícolas.

O gráfico da Figura 14 ilustra a orientação dos vetores das variáveis ambientais e paisagísticas no espaço dos componentes principais, permitindo visualizar padrões de similaridade entre os pontos amostrais. Os eixos PC1 e PC2 foram utilizados para a interpretação gráfica, pois juntos explicam quase metade da variabilidade total dos dados. A distribuição das amostras no espaço multivariado reflete a influência do uso do solo sobre a configuração ambiental dos locais amostrados. Enquanto as áreas

urbanas e de pecuária apresentaram maior dispersão, indicando maior heterogeneidade ambiental, os pontos associados a floresta e lavoura agruparam-se mais proximamente, sugerindo maior similaridade nas condições ambientais desses grupos.

Figura 14 - Análise de Componentes Principais (PCA)



6.7.2 Análise de Redundância (RDA)

A Análise de Redundância (RDA) foi aplicada para investigar a relação entre a composição da comunidade de peixes e as variáveis ambientais selecionadas. Para isso, foi realizado um processo de seleção de variáveis que incluiu a análise de colinearidade, a exclusão de variáveis com baixa contribuição preditiva baseada na Análise de Componentes Principais (PCA) e a seleção automatizada por meio da função *ordiR2step()* do pacote *vegan*. Após essa filtragem, foram retidas no modelo final duas variáveis: *Urbana_Drenagem*, que representa o percentual de uso do solo urbano na área de drenagem associada a cada ponto de amostragem, e *Substrato_Serrapilheira*, que indica a presença de material foliar acumulado no leito do rio.

Tabela 16 - Significância global do modelo

Fonte	Df	Variância	F	Pr(>F)
Modelo	2	0,067	3,17	0,002
Resíduo	21	0,224	-	-

A análise da significância global do modelo revelou que a relação entre a composição da comunidade de peixes e as variáveis ambientais retidas foi estatisticamente significativa ($F = 3,17$; $p = 0,002$; Tabela 16). O modelo de RDA explicou 23,16% da variabilidade total, indicando que os fatores selecionados explicam parte da variação observada na estrutura e composição da ictiofauna.

Tabela 17 - Contribuição Individual das Variáveis

Variável	Df	Variância	% da Variância Total	F	Pr(>F)
Urbana_Drenagem	1	0,0407	13,99%	3,82	0,002
Substrato_Serrapilheira	1	0,0267	9,17%	2,51	0,023
Resíduo	21	0,2236	76,84%	-	-

A contribuição individual das variáveis (Tabela 17) indicou que *Urbana_Drenagem* foi a variável com maior influência sobre a estruturação da comunidade, explicando 13,99% da variância total ($F = 3,82$; $p = 0,002$). A variável *Substrato_Serrapilheira* explicou 9,17% da variância, um efeito menor, mas ainda significativo ($F = 2,51$; $p = 0,023$). Isso sugere que a presença de áreas urbanizadas na bacia hidrográfica exerce um impacto mais forte sobre a composição da comunidade, enquanto a presença de serrapilheira no substrato representa um fator adicional, mas de menor magnitude, que pode influenciar a distribuição das espécies.

Tabela 18 - Variância Explicada e Significância dos Eixos da RDA

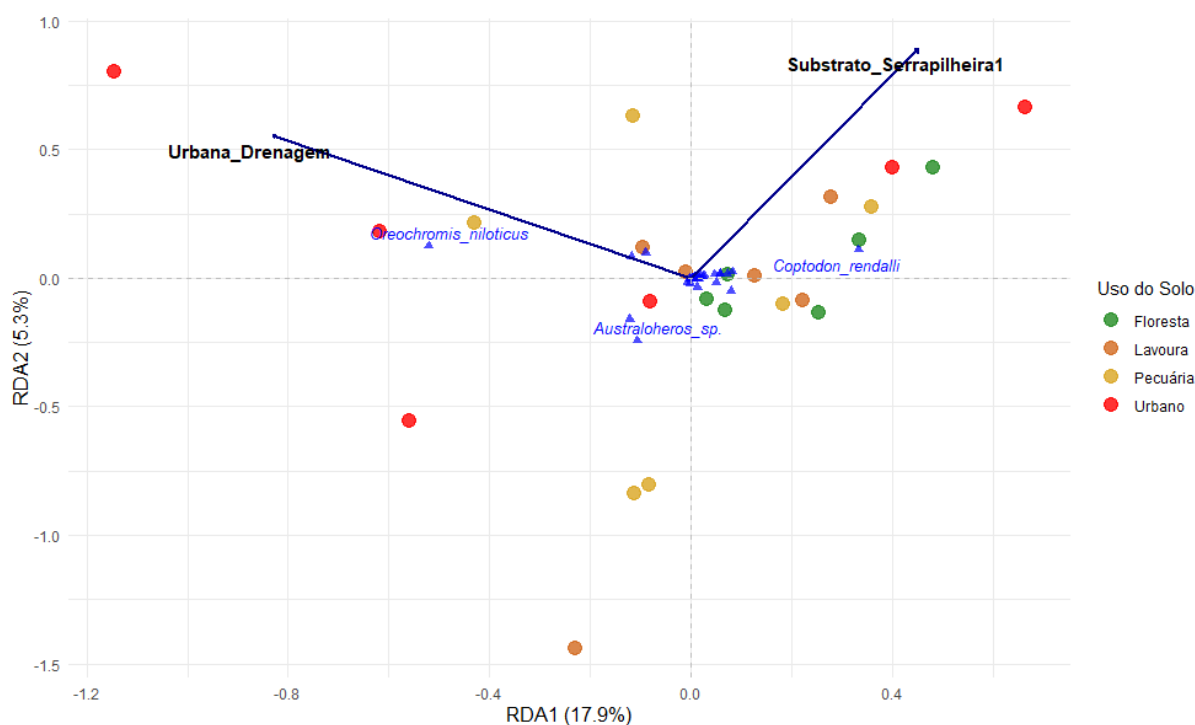
Componente	Df	Eigenvalue	Variância Explicada (%)	Variância Acumulada (%)	F	Pr(>F)
RDA1	1	0,052	17,89%	17,89%	4,89	0,003
RDA2	1	0,015	5,27%	23,16%	1,44	0,170
Resíduo	21	-	76,84%	100%	-	-

Tabela 19 - Cargas das Variáveis Ambientais nos Eixos da RDA

Variável	RDA1	RDA2
Urbana_Drenagem	-0,8171	0,5766
Substrato_Serrapilheira	0,4754	0,8798

Ao avaliar a contribuição de cada eixo da RDA (Tabela 18), observou-se que o primeiro eixo (RDA1) explicou a maior parte da variação da comunidade (17,89%; $p = 0,001$) e esteve fortemente associado à variável *Urbana_Drenagem* (carga = -0,8171; Tabela 19). Isso indica que a estrutura da ictiofauna pode estar organizada em resposta ao impacto das áreas urbanizadas. Já o segundo eixo (RDA2) explicou apenas 5,27% da variação e não foi estatisticamente significativo ($p = 0,170$), apesar de estar mais associado a *Substrato_Serrapilheira* (carga = 0,8798; Tabela 19). Isso sugere que, embora a presença de material foliar acumulado no leito do rio possa influenciar a composição da comunidade, esse efeito não é suficientemente forte para estruturar significativamente a variação dos dados.

Figura 15 - Diagrama de ordenação da análise de redundância (RDA)



A Figura 15 ilustra a ordenação das estações de amostragem e das espécies nominais ao longo dos dois primeiros eixos da RDA. As setas representam os vetores das variáveis ambientais, cuja direção e comprimento indicam a força e o gradiente

de influência sobre a composição da comunidade. O vetor Urbana_Drenagem está orientado para a esquerda do gráfico, indicando que os pontos situados nessa direção estão mais associados a ambientes com maior proporção de urbanização na área de drenagem. Por outro lado, o vetor de Substrato_Serrapilheira aponta para a direita, sugerindo que os locais nesse quadrante são caracterizados pela presença de serrapilheira no leito dos riachos.

A disposição das espécies nominais no espaço canônico reflete essas associações. *Oreochromis niloticus* encontra-se alinhada com o vetor de Urbana_Drenagem, indicando afinidade com ambientes mais urbanizados. Em contraste, *Coptodon rendalli* está mais próxima do vetor Substrato_Serrapilheira, sugerindo maior ocorrência em locais com maior aporte de matéria orgânica alóctone. *Australoheros sp.* aparece em uma posição intermediária ao longo do eixo RDA1, o que pode indicar uma resposta mista ou uma menor sensibilidade direta aos gradientes ambientais representados, estando distribuída tanto em ambientes moderadamente alterados quanto em alguns menos impactados.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, aplicamos a metodologia de eDNA metabarcoding para investigar a estrutura e a composição da ictiofauna na Bacia do Rio Mundaú, uma região neotropical marcada por intensos impactos antrópicos. Por meio do sequenciamento de amostras de água e de um rigoroso processo de curadoria, construímos uma base de dados robusta que resultou na identificação de 39 MOTUs correspondentes a 36 táxons, dos quais 9 foram atribuídos até o nível de espécie. Embora a diversidade revelada esteja parcialmente limitada pela escassa disponibilidade de sequências de referência para a ictiofauna local, os achados demonstram variações significativas na composição e diversidade das comunidades de peixes em função dos diferentes usos do solo. A integração dos resultados provenientes das análises de diversidade alfa e beta, das associações indicativas obtidas pelo IndVal e das contribuições discriminantes reveladas pelo SIMPER fornece importantes subsídios para o monitoramento e o manejo dos recursos hídricos na região, evidenciando a influência do uso antrópico da terra na estrutura e composição da comunidade ictiofaunística.

7.1 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO E PROCESSAMENTO DE DADOS

Diversos estudos têm incentivado a aplicação do metabarcoding de eDNA como uma ferramenta promissora para o monitoramento da biodiversidade aquática (Cristescu; Hebert, 2018; Dal Pont et al., 2021; Kumar et al., 2022; Mendes de Brito, 2024; Milhau et al., 2021; Miya et al., 2015; Miya; Gotoh; Sado, 2020; Pont et al., 2023; Teixeira et al., 2023; Urban et al., 2023). No entanto, sua eficácia em regiões neotropicais ainda enfrenta obstáculos significativos, sobretudo pela incompletude das bibliotecas de referência genéticas.

No presente estudo, essa limitação ficou evidente: 18 MOTUs e 8% das leituras sendo atribuídas apenas aos níveis de gênero, família ou ordem, porque as MOTUs apresentavam menos de 97% de semelhança com as sequências de referência. Essa limitação reflete um desafio recorrente em estudos de ecologia molecular em ambientes megadiversos, especialmente na região neotropical, onde a presença de espécies crípticas e de táxons ainda não descritos impõe restrições à resolução taxonômica (Mendes de Brito, 2024; Sales, 2019).

Para contornar a ausência de uma lista oficial consolidada de espécies dulcícolas para a Bacia do Rio Mundaú, elaboramos uma base de referência regional (Apêndice 3), fundamentada principalmente nos trabalhos de Berbel-Filho et al. (2018), Pereira Filho et al. (2023) e, de forma complementar, Gurgel-Lourenço et al. (2023), cujo foco se concentra em ambientes estuarinos e marinhos. Esta abordagem permitiu uma avaliação mais criteriosa da plausibilidade biogeográfica das atribuições realizadas, conforme detalhado nos critérios metodológicos adotados.

Os resultados deste estudo revelaram tanto a presença de espécies cuja ocorrência é bem documentada para a ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE), quanto de táxons cuja identificação deve ser interpretada com cautela, em função das limitações impostas pela ausência de sequências de referência específicas para o gene 12S no GenBank.

Entre os 38 táxons de peixes de água doce detectados, nove foram identificados de forma robusta até o nível de espécie, incluindo duas espécies exóticas (*Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli*) e sete espécies nativas (*Geophagus brasiliensis*, *Pygocentrus nattereri*, *Erythrinus erythrinus*, *Serrapinnus heterodon*, *Rhamdia quelen*, *Gymnotus carapo* e *Callichthys callichthys*). Essas atribuições foram suportadas por valores elevados de identidade no BLAST (99~100%), presença de sequências de referência de alta qualidade, além de sua ocorrência estar confirmada para a MNCE segundo os principais checklists disponíveis.

Para os demais táxons, a atribuição foi possível apenas até os níveis de gênero ou família, refletindo tanto a baixa representatividade de sequências para o marcador 12S nas bases públicas quanto eventuais incertezas taxonômicas associadas a grupos complexos e pouco resolvidos molecularmente. Esse padrão é particularmente evidente em grupos como *Astyanax*, *Hoplias*, *Hypostomus*, *Leporinus*, *Characidium*, *Gymnotus*, *Bryconops*, *Pimelodella*, *Prochilodus* e diversos representantes da família Cichlidae. Em muitos desses casos, é plausível que as MOTUs correspondam a espécies já presentes na ecorregião, mas que não puderam ser confirmadas ao nível específico pela ausência de dados de referência adequados.

Por outro lado, algumas detecções merecem destaque, pois podem representar potenciais expansões de distribuição ou registros ainda não documentados

formalmente para a ecorregião. Um exemplo notável é *Acestrorhynchus* sp., pertencente à família Acestrorhynchidae, que até então não havia sido registrada na MNCE (Berbel-Filho et al., 2018; Pereira Filho et al., 2023; Rosa et al., 2003). Esse achado, embora precise ser interpretado com cautela e confirmado por coletas tradicionais, sugere a possibilidade de lacunas relevantes nos inventários ictiofaunísticos da região.

Além disso, a detecção de clusters distintos dentro de alguns gêneros, como em *Astyanax* (sp. 1 e sp. 2), *Bryconops* (sp. 1 e sp. 2), *Hoplias* (sp. 1, sp. 2 e sp. 3), *Leporinus* (sp. 1 e sp. 2) e *Hypostomus* (sp. 1 e sp. 2), reflete uma possível diversidade intra-genérica não resolvida, que pode estar associada tanto à presença de múltiplas espécies locais quanto à existência de linhagens crípticas, ou simplesmente uma alta variabilidade intraespecífica para o minibarcode MiFish-U. Essas diferenças foram confirmadas por análises de alinhamento manual no software Geneious, que permitiram verificar que as MOTUs agrupadas dentro de um mesmo gênero apresentam divergências muito superiores ao limiar de 3%, o que dá suporte para tratá-las como unidades biológicas distintas.

Diante desse cenário, optamos por adotar uma abordagem conservadora na interpretação dos dados. Embora algumas MOTUs possam corresponder a espécies efetivamente presentes na bacia, mas não documentadas previamente, como pode ser o caso de *Acestrorhynchus* sp., outras podem simplesmente refletir a ausência de sequências de referência no banco de dados, especialmente para o marcador 12S utilizado. Essa cautela é particularmente necessária ao considerar o contexto biogeográfico da MNCE, uma ecorregião caracterizada por altos níveis de endemismo, históricos de isolamento hidrográfico e um evidente déficit de amostragem, sobretudo em bacias costeiras como o rio Mundaú (Berbel-Filho et al., 2018; Rosa et al., 2003; Albert & Reis, 2011).

Portanto, os resultados aqui apresentados devem ser interpretados como um avanço significativo no conhecimento da ictiofauna da bacia do rio Mundaú, mas também como um reflexo das limitações metodológicas impostas pela falta de cobertura genética adequada nos bancos de dados públicos o que reforça a importância de investir na expansão dos repositórios de sequências no Nordeste

brasileiro, especialmente em regiões de relevância como o CEP, para que futuras pesquisas possam alcançar uma resolução taxonômica mais detalhada e robusta.

Na próxima seção exploraremos detalhadamente os critérios adotados na atribuição taxonômica das MOTUs mais relevantes, avaliando sua plausibilidade biogeográfica e taxonômica no contexto da MNCE e de ecorregiões adjacentes.

Poecilia spp.

Foram detectadas duas MOTUs atribuídas ao gênero *Poecilia* (*Poecilia sp. 1* e *Poecilia sp. 2*), ambas sem possibilidade de identificação a nível específico. A MOTU *Poecilia sp. 1* apresentou como melhores matches as espécies *Poecilia velifera* e *Poecilia latipinna*, ambas com 97,6% de identidade e 100% de cobertura. A MOTU *Poecilia sp. 2* apresentou como melhor resultado uma correspondência de 100% com um registro não identificado da família (*Poeciliidae sp.*), seguido por *Poecilia reticulata* com 99,4% de identidade.

Na ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE) são reportadas cinco espécies do gênero *Poecilia* (*P. hollandi*, *P. reticulata*, *P. sarrafae*, *P. sphenops* e *P. vivipara*), das quais *P. hollandi* e *P. sarrafae* são nativas do Brasil. No entanto, apenas *P. hollandi*, *P. sphenops* e *P. reticulata* possuem sequências da região 12S disponíveis nas bases de dados (GenBank/BOLD). A ausência de sequências para *P. sarrafae* e *P. vivipara*, além do fato de que a sequência de *P. hollandi* é parcial e não se sobrepõe ao *amplicon* utilizado, impossibilita uma atribuição taxonômica precisa.

A similaridade entre *Poecilia sp. 1* e *Poecilia sp. 2* foi de apenas 94,92%. Este resultado indica que se tratam de unidades biológicas distintas dentro do gênero *Poecilia*.

Characidium spp.

Duas MOTUs foram atribuídas ao gênero *Characidium*, apresentando respectivamente 99,4% e 97,1% de identidade com espécies do sudeste do Brasil (*C. timbuiense*, *C. lagsantaense* e *C. zebra*), todas alopátricas em relação à bacia do rio Mundaú. A única espécie registrada para a região é *Characidium bimaculatum*, que não possui sequências disponíveis para o gene 12S nas bases de dados GenBank. Assim, é plausível que ambas as MOTUs representem *C. bimaculatum*, embora a

divergência observada (93,9% identidade) sugira a possibilidade de linhagens distintas, variação intraespecífica não documentada ou mesmo a presença de táxons não descritos. Devido a essas limitações, optou-se por uma atribuição conservadora como *Characidium sp. 1 (bimaculatum?)* e *Characidium sp. 2 (bimaculatum?)*. Este cenário ilustra as dificuldades inerentes à aplicação do eDNA em regiões neotropicais pouco representadas nas bibliotecas genéticas, reforçando a necessidade urgente de aumentar a cobertura taxonômica dessas bases.

Hoplias spp.

O gênero *Hoplias* apresentou três MOTUs altamente divergentes entre si, com identidades que variaram de 80% a 94%, indicando a presença de agrupamentos de sequências geneticamente distintas na bacia do rio Mundaú. A primeira MOTU apresentou 100% de cobertura e 97,6% de identidade com *Hoplias intermedius*, cuja ocorrência mais próxima está restrita à bacia do rio São Francisco, não havendo registros para a ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE). A segunda e a terceira MOTU apresentaram matches com *Hoplias malabaricus* (99,4% e 97,6%, respectivamente), *Hoplias aimara* (98,8% e 95,8%) e *Hoplias sp.* (98,8% e 95,8%).

Apesar de *H. malabaricus* ser a única espécie formalmente registrada na ecorregião, estudos recentes, como Berbel-Filho et al. (2018) e Pereira Filho et al. (Pereira Filho et al., 2023), apontam incertezas na identificação taxonômica desse táxon, frequentemente referido como *H. aff. malabaricus* ou *H. cf. malabaricus*, refletindo uma diversidade críptica ainda não resolvida dentro do gênero.

A elevada divergência observada entre as MOTUs neste estudo, com base no minibarcóde 12S, pode refletir linhagens do gênero *Hoplias* ainda não descritas, não representadas nas bases de dados genéticas atuais, ou componentes do complexo *H. malabaricus*. No entanto, essas interpretações devem ser consideradas com cautela, dado que são baseadas exclusivamente na análise de um fragmento curto do gene 12S, o que limita a resolução taxonômica e impede conclusões definitivas sobre os limites interespecíficos dentro do gênero. Diante dessa incerteza, optou-se por uma atribuição taxonômica conservadora como *Hoplias sp. 1*, *Hoplias sp. 2* e *Hoplias sp. 3*.

Bryconops sp. e Acestrorhynchus sp.

A detecção de MOTUs atribuídas aos gêneros *Bryconops* e *Acestrorhynchus*, ambos sem registros prévios para a ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE) ((Berbel-Filho et al., 2018; Gurgel-Lourenço et al., 2023; Pereira Filho et al., 2023; Teixeira et al., 2017), mas com presenças conhecidas em ecorregiões vizinhas, como Maranhão-Piauí e São Francisco, levanta uma discussão relevante sobre os limites biogeográficos e as potenciais lacunas nos inventários taxonômicos da região.

Neste caso os matches genéticos foram robustos tanto para *Acestrorhynchus* (100% de cobertura e 99,4% de identidade com *A. falcatus*) quanto para duas MOTUs atribuídas ao gênero *Bryconops*. A primeira (*Bryconops sp. 1*) apresentou 100% de cobertura e 98,9% de identidade com *B. caudomaculatus*, enquanto a segunda (*Bryconops sp. 2*) apresentou 97,7% de cobertura e 98,2% de identidade com *B. affinis*. A similaridade genética entre as duas MOTUs de *Bryconops* foi de apenas 87,4%, indicando que representam agrupamentos claramente distintos no minibarcode 12S.

A atribuição taxonômica dessas MOTUs foi, portanto, mantida nos respectivos gêneros (*Bryconops sp. 1*, *Bryconops sp. 2* e *Acestrorhynchus sp.*). Esses resultados, aliados à sua presença confirmada em ecorregiões vizinhas, tornam biogeograficamente plausível a detecção desses táxons na MNCE e, por extensão, na bacia do rio Mundaú.

Cichlidae sp.

Uma MOTU apresentou 100% de cobertura e 97,1% de identidade com *Aequidens tetramerus*, espécie amazônica não registrada para a ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE), além de um segundo match com *Cichlasoma sp.* (95,9% de identidade). Apesar da identidade com *Aequidens* estar no limiar adotado para atribuição ao nível específico, a ausência de registros do gênero na MNCE, aliada à presença de *Cichlidae* locais sem representação genética na região do minibarcode 12S (ex.: *Cichlasoma orientale*, *Crenicichla brasiliensis*, *Crenicichla menezes*), impede uma atribuição taxonômica segura. Dessa forma, optou-se por uma atribuição conservadora como *Cichlidae sp.*

Australoheros sp.

Uma MOTU atribuída ao gênero *Australoheros* apresentou 100% de cobertura e 97,6% de identidade com *Australoheros facetus* e *Australoheros sp.* Embora o gênero não esteja formalmente registrado nos principais checklists da ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE), há registros de ocorrência de *Australoheros sp.* em ecorregiões vizinhas, como Maranhão-Piauí e São Francisco, conforme dados do SpeciesLink.

A elevada similaridade obtida, associada à presença confirmada do gênero em drenagens adjacentes, torna biogeograficamente plausível a sua detecção na bacia do rio Mundaú. No entanto, considerando que os ciclídeos representam um dos grupos mais relevantes no comércio de peixes ornamentais, com ampla distribuição facilitada por atividades de aquarioria e piscicultura ornamental (Monticini, 2010), não se pode descartar a possibilidade de que esta ocorrência resulte de introdução antrópica. Diante desse cenário, e na ausência de informações conclusivas sobre sua origem natural ou exótica, optou-se por uma atribuição conservadora como *Australoheros sp.*

Anostomidae spp.

O grupo Anostomidae apresentou três MOTUs altamente divergentes entre si, com identidade genética que variou de 83,2% a 90,1%, indicando de forma inequívoca a presença de linhagens geneticamente distintas na bacia do rio Mundaú. Duas dessas MOTUs exibiram matches com espécies não registradas para a ecorregião, sendo *Leporinus copelandii* (99,4% de identidade, 100% de cobertura) para *Leporinus sp. 1*, e *Leporinus lacustris* (97,7% de identidade, 100% de cobertura) para *Leporinus sp. 2*. A terceira MOTU, atribuída como Anostomidae sp., apresentou matches de 100% de identidade e cobertura com *Megaleporinus macrocephalus* e *Leporinus steindachneri*.

O fato de que as sequências disponíveis para *Leporinus piau* e *L. taeniatus* correspondem a fragmentos que não se sobrepõem à região do minibarcode 12S, somado à ausência completa de sequências desse gene para *Leporinus melanopleura*, todas elas espécies documentadas para a ecorregião da Caatinga médio-nordestina (MNCE), impossibilita uma atribuição taxonômica precisa.

Assim, considerando tanto a robustez dos dados genéticos quanto as limitações das bases de referência, optou-se por uma atribuição conservadora como *Anostomidae sp.*, *Leporinus sp. 1* e *Leporinus sp. 2*.

Espécies exóticas

Em relação à detecção de MOTUs atribuídas a espécies exóticas, nossos dados evidenciam a presença de táxons correspondentes a *Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli*. Segundo Moreira & Silva (Moreira; Silva, 2023), *O. niloticus* é amplamente reportada em todas as principais bacias hidrográficas do Brasil, ocorrendo em ambientes artificiais e naturais dos biomas da Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Caatinga e Amazônia, embora sua presença seja mais acentuada nas regiões Nordeste e Sudeste. Por sua vez, *Coptodon rendalli*, a primeira tilápia introduzida no país desde 1950, encontra-se distribuída de maneira abrangente, com registros em estados como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Pernambuco e Amapá.

Em relação aos impactos dessas espécies invasoras, as tilápias *Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli* estão associadas a efeitos ambientais significativos, tais como a redução da biomassa do zooplâncton, a propagação de parasitas (aos quais demonstram alta resistência) e alterações na qualidade da água (Moreira; Silva, 2023). Tais efeitos podem levar à redução da densidade de espécies nativas e à dominância dos invasores, contribuindo para a perda de diversidade biológica (Moreira; Silva, 2023).

Esses achados são particularmente relevantes em riachos de cabeceira (sendo que nosso estudo abrange riachos de primeira a terceira ordem) que oferecem uma variedade enorme de habitats para microrganismos, plantas e animais. Tais sistemas são áreas sensíveis para a conservação da biodiversidade aquática, devido à sua baixa riqueza de espécies e alto grau de endemismo, características que os definem como ambientes suscetíveis ao estabelecimento de espécies não nativas, e que figuram entre os sistemas mais ameaçados do planeta (Magalhães; Jacobi, 2017).

Em síntese, a detecção de MOTUs atribuídas a espécies exóticas neste estudo reforça o potencial do eDNA metabarcoding para a identificação precoce de invasores

em ecossistemas aquáticos. A detecção antecipada é essencial para que medidas de controle ou erradicação sejam implementadas antes que esses invasores se tornem altamente abundantes e causem impactos irreversíveis na biodiversidade local (Balasingham et al., 2018). Assim, além de ampliar o conhecimento sobre a ictiofauna da Bacia do Rio Mundaú, os resultados fornecem subsídios valiosos para a formulação de estratégias de monitoramento e manejo (Balasingham et al., 2018; Lodge et al., 2012), especialmente em sistemas de cabeceira, que são áreas sensíveis devido à baixa riqueza de espécies e alto grau de endemismo (Magalhães; Jacobi, 2017).

Uma possível explicação para a ausência de uma distinção clara entre os ambientes florestais e aqueles impactados por atividades antrópicas pode estar relacionada à baixa resolução taxonômica decorrente da escassez de sequências de referência para a região. Essa limitação pode ter influenciado a detecção e a correta atribuição de táxons específicos, reduzindo a capacidade de identificar padrões de segregação mais nítidos entre os diferentes tipos de uso do solo. Além disso, considerando que este estudo avaliou riachos de cabeceira, é importante destacar que esses ambientes são caracterizados por uma estrutura altamente heterogênea, oferecendo uma ampla diversidade de micro-habitats que sustentam uma biota especializada e frequentemente endêmica. Essa hipótese é reforçada pelos dados do presente estudo, que indicam que, do total de MOTUs e reads identificados para os ambientes florestais, 31% (11 MOTUs) das atribuições não atingiram o limiar de similaridade de 97% e foram classificadas apenas nos níveis de gênero ou família, representando 17% (688 *reads*) do total de sequências recuperadas.

7.2 DIVERSIDADE ALFA NOS PONTOS DE AMOSTRAGEM

Os resultados referentes à diversidade alfa e à curva de acumulação revelaram padrões claros que refletem a influência do uso do solo na estrutura da ictiofauna da Bacia do Rio Mundaú. A curva de acumulação indicou que o esforço amostral foi adequado para capturar a maior parte da diversidade presente nos ambientes estudados, alcançando 50% da riqueza total com apenas 4 amostras e 75% com 9 amostras. No entanto, o acréscimo de 4 espécies nas últimas 10 amostras e de aproximadamente 1,4 nas 5 finais sugere que a inclusão de novos pontos de coleta poderia revelar espécies de ocorrência mais restrita ou baixa abundância.

Cabe destacar que o foco deste estudo não foi descrever a ictiofauna de toda a bacia, mas detectar padrões de diversidade associados ao tipo de uso do solo. Por esse motivo, o trabalho concentrou-se em ambientes homogêneos, limitando-se a riachos de ordem 1 a 3, conforme a classificação de Strahler. Dessa forma, podemos afirmar que o esforço amostral foi suficiente para esse tipo de ambiente; contudo, para avaliar a completude da diversidade a nível de bacia, seria necessário ampliar a amostragem para incluir uma variedade maior de ambientes aquáticos, como o canal principal, que pode atingir até a ordem 7 (Gomes, 2015).

Os índices de diversidade alfa apresentaram variações marcantes entre os pontos amostrados. De forma geral, áreas de floresta, lavoura e pecuária sustentaram comunidades mais ricas e equitativas, enquanto os pontos localizados em ambientes urbanos apresentaram menor riqueza de espécies, menor diversidade (Shannon) e maior variabilidade nos índices de equitabilidade (Pielou) e dominância (Simpson). Isso sugere uma maior instabilidade nas comunidades associadas às áreas urbanas, possivelmente em decorrência dos impactos antrópicos mais intensos.

Essa tendência ficou evidenciada pelo teste de Kruskal-Wallis aplicado ao índice de Shannon, que apontou uma diferença significativa entre os tipos de uso do solo ($p = 0,025$). As análises post-hoc indicaram que a única diferença significativa, após correção, ocorreu entre as áreas de lavoura e urbana. Comparações entre floresta e urbana apresentaram tendência à significância, embora não tenham se mantido após o ajuste de Benjamini-Hochberg, o que sugere que as variações entre ambientes mais preservados podem ser parcialmente mascaradas por fatores como a presença de espécies tolerantes ou generalistas.

Esses resultados ilustram a complexidade dos impactos antrópicos sobre os ecossistemas de cabeceira. Embora processos como urbanização, desmatamento e alterações no uso do solo possam modificar a estrutura das comunidades ictiológicas (Seabra; Benone; Montag, 2022; Wright; Flecker, 2004), os efeitos nem sempre se manifestam de forma uniforme. Por um lado, estudos indicam que o desmatamento e o aumento da carga orgânica decorrentes das atividades agrícolas e pecuárias podem levar à perda de espécies sensíveis e, conseqüentemente, à diminuição da diversidade (Leitão et al., 2018; Seabra; Benone; Montag, 2022; Wright; Flecker, 2004). Por outro lado, Dala-Corte et al. (2016) observaram que, em determinadas

condições, o desmatamento ripário pode até aumentar a riqueza de espécies ao elevar a produção primária, embora tais ganhos se concentrem, majoritariamente, em espécies tolerantes ou de coluna d'água. Assim, os resultados deste estudo evidenciam que as respostas em termos de diversidade alfa variam conforme o contexto ambiental, ressaltando a necessidade de análises mais aprofundadas para compreender plenamente os efeitos dos impactos antrópicos sobre a ictiofauna.

7.3 INFLUÊNCIA DO USO DO SOLO NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE PEIXES

A análise dos resultados de diversidade beta e do NMDS revelou que a composição da ictiofauna varia entre os diferentes tipos de uso do solo, indicando que o uso antrópico exerce uma influência moderada, embora estatisticamente marginal ($p = 0,096$), na estrutura das comunidades de peixes, mas sem uma segregação completa entre os ambientes, conforme indicado pela sobreposição no NMDS. Esse padrão sugere que outros fatores ambientais e ecológicos, além do uso do solo, também desempenham um papel relevante na configuração da comunidade ictiofaunística.

A influência do uso do solo na composição da ictiofauna é amplamente reconhecida na literatura (Kang et al., 2024; Li et al., 2023; Seabra; Benone; Montag, 2022). Neste estudo, os resultados evidenciam um moderado impacto da urbanização na estrutura da comunidade de peixes, possivelmente associado ao aumento da poluição orgânica e inorgânica, às modificações na hidrodinâmica e à perda de habitats naturais (Gerhard, 2005).

A análise PERMANOVA revelou um efeito do uso do solo sobre a composição da ictiofauna ($F = 1,38$; $R^2 = 17,2\%$; $p = 0,096$), representando uma evidência moderada de que o uso do solo influencia a estrutura das assembleias, segundo as diretrizes propostas por Muff et al. (2022), que recomendam interpretar os resultados como um gradiente de evidências. Essa interpretação é particularmente relevante em estudos ecológicos de campo, onde a alta variabilidade natural frequentemente dificulta atingir limiares arbitrários como $p < 0,05$.

A análise pareada reforçou esse padrão, destacando que as maiores dissimilaridades ocorreram nas comparações envolvendo ambientes urbanos,

especialmente entre Floresta e Urbano ($p = 0,071$, p ajustado = $0,297$) e Lavoura e Urbano ($p = 0,099$, p ajustado = $0,297$), valores que, embora não estejam dentro do limiar convencional de significância, oferecem evidência fraca de diferenciação nessas comparações. Esses achados sugerem que os ambientes urbanos têm uma composição ictiofaunística diferenciada em relação às áreas de Floresta e Lavoura, provavelmente refletindo impactos mais intensos, como poluição, alteração do habitat e perda da vegetação ripária.

7.4 ANÁLISE DE ESPÉCIES INDICADORAS E CONTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES NOMINAIS PARA A DISSIMILARIDADE ENTRE AMBIENTES

A análise de Valor Indicador (IndVal) revelou padrões interessantes na distribuição das espécies em função dos diferentes usos do solo. Três táxons apresentaram valores de IndVal elevados e estatisticamente significativos, evidenciando forte associação com os respectivos ambientes.

As espécies *Callichthys callichthys* e *Poecilia sp. 1* foram identificadas como indicadoras de áreas de pecuária (IndVal = $0,542$; $p = 0,029$ e IndVal = $0,500$; $p = 0,041$, respectivamente). Esse padrão sugere que esses táxons, além de possuírem ampla tolerância ambiental, se beneficiam das condições frequentemente associadas a esse tipo de uso do solo, como o aumento da carga orgânica, maior turbidez e homogeneização do habitat, características amplamente documentadas em ambientes sob influência de atividades pecuárias (Dala-Corte et al., 2016; Seabra; Benone; Montag, 2022).

Por outro lado, a espécie exótica *Oreochromis niloticus* apresentou um valor de IndVal elevado para ambientes urbanos (IndVal = $0,572$; $p = 0,055$), indicando uma forte afinidade com sistemas fortemente impactados pela urbanização. Este resultado é coerente com a literatura (Attayde; Brasil; Menescal, 2011; Charvet et al., 2021), que destaca a alta plasticidade ecológica da tilápia e sua capacidade de colonizar ambientes degradados, frequentemente associada à introdução antrópica deliberada ou acidental.

Não foram detectadas espécies indicadoras para as áreas de floresta ou lavoura, o que sugere que esses ambientes compartilham uma comunidade de peixes com composição relativamente semelhante e dominada por espécies generalistas. Este

padrão pode estar, em parte, modulado pela presença da espécie invasora *Coptodon rendalli*, que ocorre em ambos os ambientes e pode estar contribuindo para a homogeneização da ictiofauna local.

Os resultados do SIMPER complementaram esses achados, identificando as espécies que mais contribuíram para as diferenças na composição ictiofaunística entre os diferentes usos do solo. *Coptodon rendalli* apresentou consistentemente a maior contribuição média para a dissimilaridade em todos os contrastes, variando de 12,2% a 17,6%. Na comparação entre Floresta e Pecuária, destacou-se também *Hoplias sp. 2* com uma contribuição de 10,2% ($p = 0,050$), o que representa uma evidência moderada de que essa espécie diferencia esses ambientes.

De forma semelhante, *Poecilia sp. 1* desempenhou um papel relevante nas comparações que envolvem pecuária, especialmente em Floresta vs. Pecuária (7,36%; $p = 0,004$) e Lavoura vs. Pecuária (7,36%; $p = 0,006$), oferecendo evidência de que essa espécie está fortemente associada aos ambientes de pecuária. A tilápia *Oreochromis niloticus*, uma espécie exótica, também apareceu como um dos principais contribuintes nas comparações entre ambientes naturais e urbanos, com uma contribuição de 15,56% em Floresta vs. Urbano ($p = 0,016$), reforçando o papel de espécies exóticas na modificação da estrutura da comunidade em ambientes antropizados.

No entanto, na maioria dos contrastes, especialmente aqueles envolvendo ambientes urbanos, os valores de p foram superiores a 0,05, indicando evidência estatística fraca. Porém, os altos valores de contribuição das espécies sugeriram que essas diferenças podem ser ecologicamente relevantes.

Com relação à hipótese H_1 , os resultados obtidos indicam que ela foi parcialmente corroborada. De fato, as análises demonstraram que o uso do solo exerce influência na composição e na estrutura da comunidade de peixes, refletindo mudanças nos padrões de diversidade alfa e beta entre os ambientes estudados. No entanto, essas diferenças não foram suficientemente fortes para gerar uma segregação completa entre os locais preservados (Floresta) e os ambientes impactados (Lavoura, Pecuária e Urbana), conforme evidenciado pela sobreposição

observada no NMDS e pela ausência de significância estatística robusta nas análises PERMANOVA pareadas.

Essa ausência de uma diferenciação mais acentuada pode estar associada a múltiplos fatores. Primeiramente, destaca-se a baixa resolução taxonômica, decorrente da limitada cobertura das bibliotecas de referência genômica para a ictiofauna da região. Tal limitação comprometeu a identificação precisa de diversas MOTUs, reduzindo o poder discriminativo para detectar padrões mais claros na composição das assembleias. Isso é corroborado pelo fato de que, nos ambientes florestais, 31% das MOTUs (11 de 35 MOTUs) e 17% dos reads (688 de 4119) não atingiram o limiar de similaridade $\geq 97\%$, sendo atribuídas apenas aos níveis de gênero ou família.

Adicionalmente, é importante considerar que o presente estudo focou exclusivamente em riachos de cabeceira, sistemas naturalmente caracterizados por alta heterogeneidade física e ambiental. Esses ecossistemas oferecem uma diversidade de micro-habitats, capazes de sustentar comunidades resilientes, compostas por espécies adaptadas às condições variáveis, o que pode atenuar os efeitos dos impactos antrópicos na escala local.

7.5 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS AMBIENTAIS NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE

Os resultados deste estudo evidenciam que a estrutura da comunidade de peixes está fortemente associada a variáveis ambientais locais e paisagísticas, com destaque para o uso do solo e a composição do substrato. A Análise de Componentes Principais (PCA) revelou que os pontos de amostragem estão organizados ao longo de dois gradientes ambientais principais. O primeiro componente (PC1) refletiu variações relacionadas a características hidrológicas, como profundidade média, largura do canal e vazão, enquanto o segundo componente (PC2) destacou a influência do uso do solo, especialmente a cobertura florestal e agrícola. Esses resultados sugerem que a configuração ambiental dos locais amostrados é moldada tanto por fatores locais (hidrológicos) quanto por características da paisagem circundante, o que pode influenciar diretamente a distribuição e composição da ictiofauna.

A Análise de Redundância (RDA) reforçou essas observações ao identificar que a urbanização e a presença de serapilheira no substrato são os principais fatores estruturadores da comunidade de peixes. A variável *Urbana_Drenagem* foi a mais influente, explicando 13,99% da variância total ($F = 3,82$; $p = 0,002$). Esse resultado sugere que o aumento da cobertura urbana na bacia de drenagem tem um impacto negativo significativo sobre a biodiversidade aquática, possivelmente devido ao aumento da sedimentação, poluição e perda de complexidade estrutural dos habitats. Além disso, os efeitos da urbanização não se restringem à escala local, mas se estendem a toda a bacia hidrográfica, influenciando a composição da ictiofauna em escalas espaciais mais amplas. Isso reforça a ideia de que as alterações no uso do solo, especialmente em áreas urbanizadas, podem ter consequências abrangentes para os ecossistemas aquáticos, afetando não apenas os locais diretamente impactados, mas também áreas adjacentes e a jusante.

A presença de serapilheira no substrato (*Substrato_Serrapilheira*) também desempenhou um papel importante, embora de menor magnitude, explicando 9,17% da variância ($F = 2,51$; $p = 0,023$). Essa variável está associada à disponibilidade de microhabitats e recursos tróficos, como biofilmes e invertebrados aquáticos, que são essenciais para muitas espécies de peixes. A serapilheira pode atuar como um refúgio, além de aumentar a retenção de matéria orgânica no leito dos rios, favorecendo a diversidade biológica.

A distribuição das espécies no espaço da RDA também reflete essas associações. Por exemplo, *Coptodon rendalli* mostrou uma forte relação com locais caracterizados pela presença de serrapilheira, enquanto *Australoheros sp.* se manteve em uma posição intermedia, sugerindo que essa espécie é mais tolerante a condições ambientais variáveis. Por outro lado, as áreas urbanizadas não demonstraram uma associação clara com espécies específicas, a exceção de *Oreochromis niloticus*, indicando maior variabilidade na composição da ictiofauna nesses locais.

Esses padrões são consistentes com estudos anteriores que destacam a influência de variáveis hidrológicas e paisagísticas na estruturação de comunidades de peixes em rios tropicais (Gerhard, 2005; Montag et al., 2019; Roa-Fuentes et al., 2022). Portanto, os resultados deste estudo reforçam a importância de considerar

tanto fatores locais quanto paisagísticos no manejo e conservação de ecossistemas aquáticos, especialmente em regiões impactadas pela urbanização e mudanças no uso do solo.

7.6 IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO, LIMITAÇÕES E DIREÇÕES FUTURAS

Os achados deste estudo reforçam a necessidade de medidas de conservação que considerem tanto os impactos locais quanto os efeitos da paisagem na estrutura da comunidade de peixes. Os resultados indicam que a estruturação da comunidade na Bacia do Rio Mundaú é influenciada tanto por fatores ambientais quanto por variações no uso do solo, com destaque para o efeito pronunciado da urbanização, que se mostrou o principal fator de modificação na composição ictiofaunística. Esse impacto negativo da urbanização sobre a biodiversidade aquática evidencia a urgência de estratégias de manejo que mitiguem os efeitos da conversão de áreas naturais para uso urbano, como a restauração de matas ripárias (Dala-Corte et al., 2016; Wright; Flecker, 2004).

Apesar dos resultados obtidos, algumas limitações devem ser consideradas. A abordagem de eDNA metabarcoding pode apresentar desafios relacionados à disponibilidade limitada de sequências de referência e à amplificação diferencial de certos grupos taxonômicos. No caso dos primers MiFish, essas dificuldades já foram documentadas para famílias como Heptapteridae e Pimelodidae, além de alguns representantes da Characiformes (Hilário et al., 2023; Jackman et al., 2021; Teixeira et al., 2023). Outro desafio importante é a dificuldade de correlacionar os resultados do sequenciamento com a abundância real das espécies, um fator que pode influenciar a interpretação dos padrões ecológicos observados.

Diante dessas limitações, estudos futuros poderiam integrar dados de capturas tradicionais para validar as inferências obtidas, além de adotar uma abordagem com múltiplos primers para ampliar a detecção de grupos taxonômicos sub-representados. Além disso, o aprimoramento das bases de dados de referência, especialmente para regiões pouco estudadas, como a bacia do Rio Mundaú, seria essencial para garantir uma caracterização mais precisa da diversidade ictiofaunística local e fortalecer a aplicabilidade do eDNA no monitoramento da biodiversidade aquática.

A inclusão de outras variáveis ambientais, como parâmetros físicoquímicos e indicadores de qualidade da água, também poderia fornecer uma compreensão mais abrangente dos fatores que modulam a estrutura da comunidade de peixes nos diferentes tipos de uso do solo. Um estudo padronizado e mais profundo em relação às variáveis locais, como características dos habitats, tipos de substrato e cobertura vegetal ripária, pode melhorar significativamente a avaliação da contribuição desses componentes na estruturação da comunidade de peixes. Além disso, a investigação de processos temporais, considerando variações sazonais, contribuiria para um entendimento mais refinado da dinâmica ecológica da ictiofauna na região. Essas abordagens permitiriam uma análise mais detalhada dos mecanismos que influenciam a distribuição e a diversidade das espécies, fornecendo subsídios para estratégias de conservação mais eficazes.

8 CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou que a estrutura da comunidade de peixes na Bacia do Rio Mundaú é fortemente influenciada pelo uso do solo, com impactos marcantes da urbanização, da conversão florestal e da composição do substrato. Os resultados confirmam parcialmente a hipótese de que o uso antrópico da terra altera significativamente a estrutura ictiofaunística, sendo as áreas urbanas os ambientes mais impactados.

Apesar disso, a ausência de uma segregação completa entre os diferentes tipos de uso do solo indica que a influência antrópica, embora significativa, não é o único fator determinante. Características ambientais locais, como a heterogeneidade física dos riachos de cabeceira, bem como limitações metodológicas, como a baixa resolução taxonômica decorrente da escassez de sequências de referência para o minibarcoding 12S na região, contribuíram para atenuar os padrões de diferenciação esperados entre os ambientes.

A intensificação da urbanização demonstrou efeitos diretos na estrutura da comunidade, possivelmente associados à poluição, à alteração da hidrodinâmica e à degradação dos habitats aquáticos. Além disso, os impactos da urbanização não se restringem à escala local, mas se manifestam em níveis mais amplos, como na sub-bacia e na área total de drenagem, influenciando a composição da comunidade a distâncias superior ao esperado para impactos exclusivamente locais.

A detecção robusta de nove espécies de água doce, incluindo as exóticas invasoras *Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli*, além de uma diversidade não totalmente resolvida em grupos como *Hoplias*, *Astyanax*, *Bryconops* e *Leporinus*, reforça tanto a eficácia do eDNA metabarcoding na caracterização da biodiversidade aquática quanto as lacunas existentes nos bancos de dados genéticos para a ictiofauna da Caatinga médio-nordestina (MNCE).

Os resultados também destacam o papel preocupante das espécies exóticas na modificação da estrutura comunitária, especialmente em ambientes urbanos e de pecuária, corroborando a necessidade urgente de estratégias de monitoramento e controle dessas espécies. A presença de tilápias e outros invasores evidencia que os riachos de cabeceira, por suas características ecológicas, são particularmente

vulneráveis aos impactos biológicos e ambientais decorrentes da urbanização e das práticas antrópicas.

Apesar das importantes contribuições deste trabalho, limitações metodológicas devem ser reconhecidas, incluindo: (i) a incompletude das bases de dados genéticas, que compromete a identificação taxonômica de parte das MOTUs; (ii) a dificuldade de inferir abundância real com base na quantidade de reads; e (iii) a possibilidade de subdetecção de determinados grupos taxonômicos devido ao viés dos primers utilizados. Além disso, a inclusão de variáveis adicionais, como parâmetros físicoquímicos da água e análises sazonais, poderia proporcionar uma visão mais abrangente dos fatores que determinam a estrutura da comunidade de peixes.

Estudos futuros que integrem metodologias complementares, como capturas tradicionais para validar as inferências obtidas pelo eDNA, além da utilização de múltiplos primers para ampliar a cobertura taxonômica, poderão aprimorar a compreensão sobre os impactos antrópicos na biodiversidade aquática. Investimentos na expansão das bibliotecas genéticas, especialmente para a ictiofauna do Nordeste brasileiro, são fundamentais para o avanço das aplicações do eDNA como ferramenta de monitoramento ambiental e conservação.

Este estudo reforça, portanto, o potencial do eDNA metabarcoding como uma ferramenta eficiente, sensível e de alta resolução para avaliar os efeitos da urbanização e das mudanças no uso do solo sobre a biodiversidade aquática. Além disso, destaca-se sua aplicabilidade na detecção precoce de espécies invasoras e na geração de dados fundamentais para embasar ações de gestão e conservação dos recursos hídricos na bacia do Rio Mundaú.

Por fim, os achados reforçam a urgência na proteção e recuperação das áreas de vegetação ripária, na implementação de políticas públicas que limitem a expansão urbana desordenada e no controle rigoroso das espécies exóticas, visando garantir a integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos da Caatinga médio-nordestina e a sustentabilidade dos serviços ecossistêmicos que esses ambientes proporcionam.

9 REFERENCIAS

ALBERT, James S.; REIS, Roberto E. **Historical biogeography of neotropical freshwater fishes**. Berkeley: University of California Press, 2011.

ALBERTS, Bruce *et al.* **Molecular biology of the cell**. Seventh edition, international student edition ed. New York, NY London: W. W. Norton & Company, 2022.

ANDERSON, Marti J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, n. 1, p. 32–46, fev. 2001.

ANDERSON, Marti J. Distance-Based Tests for Homogeneity of Multivariate Dispersions. **Biometrics**, v. 62, n. 1, p. 245–253, mar. 2006.

ATTAYDE, J. L.; BRASIL, J.; MENESCAL, R. A. Impacts of introducing Nile tilapia on the fisheries of a tropical reservoir in North-eastern Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, v. 18, n. 6, p. 437–443, dez. 2011.

BALASINGHAM, Katherine D. *et al.* Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 1, p. 112–127, jan. 2018.

BARNES, Matthew A.; TURNER, Cameron R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. **Conservation Genetics**, v. 17, n. 1, p. 1–17, fev. 2016.

BARROS, Alexandre *et al.* Bioavailability of heavy metals in mangrove soil in Alagoas, Brazil. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 3, p. 818–825, 11 jun. 2019.

BERBEL-FILHO, Waldir M. *et al.* Updated checklist and DNA barcode-based species delimitations reveal taxonomic uncertainties among freshwater fishes from the mid-north-eastern Caatinga ecoregion, north-eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 93, n. 2, p. 311–323, ago. 2018.

BERRY, Tina E. *et al.* DNA metabarcoding for diet analysis and biodiversity: A case study using the endangered Australian sea lion *Neophoca cinerea*. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 14, p. 5435–5453, jul. 2017.

BLANCHET, F. Guillaume; LEGENDRE, Pierre; BORCARD, Daniel. FORWARD SELECTION OF EXPLANATORY VARIABLES. **Ecology**, v. 89, n. 9, p. 2623–2632, set. 2008.

BORCARD, Daniel; GILLET, François; LEGENDRE, Pierre. **Numerical ecology with R**. Second edition ed. Cham: Springer, 2018.

BRUCE, Kat *et al.* **A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment**. [S.l.]: Pensoft Publishers, 2021.

BYLEMANS, Jonas *et al.* Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 17, p. 8697–8712, set. 2018.

CÁCERES, Miquel De; LEGENDRE, Pierre. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. **Ecology**, v. 90, n. 12, p. 3566–3574, dez. 2009.

CANTERA, Isabel *et al.* Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. **Scientific Reports**, v. 9, p. 3085, 28 fev. 2019.

CANTERA, Isabel *et al.* Characterizing the spatial signal of environmental DNA in river systems using a community ecology approach. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 4, p. 1274–1283, maio 2022.

CANTERA, Isabel *et al.* Describing functional diversity of communities from environmental DNA. **Trends in Ecology & Evolution**, p. S0169534724002581, nov. 2024.

CAPO, Eric *et al.* Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0226638, 18 dez. 2019.

CARIM, K. J. *et al.* An environmental DNA assay for detecting Arctic grayling in the upper Missouri River basin, North America. **Conservation Genetics Resources**, v. 8, n. 3, p. 197–199, set. 2016a.

CARIM, Kellie J. *et al.* **A protocol for collecting environmental DNA samples from streams**. Ft. Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 2016b. Disponível em: <<https://www.fs.usda.gov/treesearch/pubs/52466>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

CARVALHO, Carolina S. *et al.* Efficiency of eDNA and iDNA in assessing vertebrate diversity and its abundance. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 4, p. 1262–1273, maio 2022.

CATCHEN, Julian *et al.* Stacks: an analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 3124–3140, jun. 2013.

CAVALCANTI, Helene Ferreira. **Avaliação ambiental de nascentes do Rio Mundaú, Garanhuns - PE**. [S.l.]: Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, 20 mar. 2013.

CHARVET, Patricia *et al.* Tilapia farming threatens Brazil's waters. **Science**, v. 371, n. 6527, p. 356–356, 22 jan. 2021.

CHENG, Ruli *et al.* eDNA metabarcoding reveals differences in fish diversity and community structure in heterogeneous habitat areas shaped by cascade hydropower. **Ecology and Evolution**, v. 13, n. 7, p. e10275, 2023.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, n. 1, p. 117–143, mar. 1993.

CRISTESCU, Melania E.; HEBERT, Paul D. N. Uses and Misuses of Environmental DNA in Biodiversity Science and Conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 49, n. 1, p. 209–230, 2 nov. 2018.

DAL PONT, Giorgi *et al.* Monitoring fish communities through environmental DNA metabarcoding in the fish pass system of the second largest hydropower plant in the world. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23167, 30 nov. 2021.

DALA-CORTE, Renato B. *et al.* Revealing the pathways by which agricultural land-use affects stream fish communities in South Brazilian grasslands. **Freshwater Biology**, v. 61, n. 11, p. 1921–1934, nov. 2016.

DALA-CORTE, Renato B. *et al.* Beta diversity of stream fish communities along anthropogenic environmental gradients at multiple spatial scales. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 5, p. 288, maio 2019.

DEINER, Kristy *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 21, p. 5872–5895, nov. 2017.

DENG, Jie *et al.* eDNA metabarcoding reveals differences in fish diversity and community structure in Danjiang River. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 29460, 27 nov. 2024.

DICKIE, Ian A. *et al.* Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA - based studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 18, n. 5, p. 940–952, set. 2018.

DOI, Hideyuki *et al.* Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122763, 23 mar. 2015.

DOS SANTOS, Mayara *et al.* Evaluation of Potentially Toxic Elements in Mundaú Lagoon (Maceió, AL-Brazil): Systematic Environmental Monitoring of Water and Food Quality. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2021.

DUFRÊNE, Marc; LEGENDRE, Pierre. SPECIES ASSEMBLAGES AND INDICATOR SPECIES: THE NEED FOR A FLEXIBLE ASYMMETRICAL APPROACH. **Ecological Monographs**, v. 67, n. 3, p. 345–366, ago. 1997.

FAUSCH, Kurt D. *et al.* Landscapes to Riverscapes: Bridging the Gap between Research and Conservation of Stream Fishes. **BioScience**, v. 52, n. 6, p. 483, 2002.

FRIMPONG, Emmanuel A. *et al.* Determination of optimal riparian forest buffer dimensions for stream biotalandscape association models using multimetric and multivariate responses. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 62, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2005.

GERHARD, Pedro. **Comunidades de peixes de riachos em função da paisagem da bacia do rio Corumbataí, estado de São Paulo**. Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas—Piracicaba: Universidade de São Paulo, 3 mar. 2005.

GOMES, Daniel Dantas Moreira. **Geoprocessamento aplicado à análise e zoneamento dos sistemas ambientais da bacia hidrográfica do Rio Mundaú - PE/AL.** [S.l.: S.n.].

GOMES, Daniel Dantas Moreira *et al.* Mapeamento e caracterização dos sistemas ambientais da bacia hidrográfica do Rio Mundaú -PE/AL. **Caderno de Geografia**, v. 26, n. 2, p. 272–299, 2016.

GOTELLI, Nicholas J.; COLWELL, Robert K. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. **Ecology Letters**, v. 4, n. 4, p. 379–391, 22 jul. 2001.

GURGEL-LOURENÇO, Ronaldo César *et al.* Fish fauna from the estuaries of Ceara; state, Brazil: a checklist in support of conservation of the Brazilian semiarid coast. **Check List**, v. 19, n. 1, p. 63–90, 13 fev. 2023.

HAUER, F. Richard; LAMBERTI, Gary Anthony (ORGS.). **Methods in stream ecology.** Third edition ed. London, United Kingdom ; San Diego, CA, United States: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2017.

HILÁRIO, Heron Oliveira *et al.* DNA metabarcoding of mock communities highlights potential biases when assessing Neotropical fish diversity. **Environmental DNA**, v. n/a, n. n/a, 2023.

HYNES, H. B. N. The stream and its valley: With 4 figures and 2 tables in the text. **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 19, n. 1, p. 1–15, out. 1975.

JACKMAN, Jake M. *et al.* eDNA in a bottleneck: Obstacles to fish metabarcoding studies in megadiverse freshwater systems. **Environmental DNA**, v. 3, n. 4, p. 837–849, jul. 2021.

JOSEPH, Chipuriro *et al.* Persistence and degradation dynamics of eDNA affected by environmental factors in aquatic ecosystems. **Hydrobiologia**, v. 849, n. 19, p. 4119–4133, nov. 2022.

KANG, Yujin *et al.* Land use characteristics affect the sub-basinal scale urban fish community identified by environmental DNA metabarcoding. **Landscape and Ecological Engineering**, v. 20, n. 2, p. 163–185, abr. 2024.

KELLY, Ryan P. *et al.* Harnessing DNA to improve environmental management. **Science**, v. 344, n. 6191, p. 1455–1456, 27 jun. 2014.

KUMAR, Girish *et al.* Comparing eDNA metabarcoding primers for assessing fish communities in a biodiverse estuary. **PLOS ONE**, v. 17, n. 6, p. e0266720, 17 jun. 2022.

LARAMIE, Matthew B. *et al.* **Environmental DNA sampling protocol - filtering water to capture DNA from aquatic organisms:** Techniques and Methods. Reston, VA: [S.n.]. Disponível em: <<http://pubs.er.usgs.gov/publication/tm2A13>>.

LEGENDRE, Pierre; LEGENDRE, Louis. **Numerical ecology.** 2. Engl. ed., reprinted ed. Amsterdam: Elsevier, 2006.

LEITÃO, Rafael P. *et al.* Disentangling the pathways of land use impacts on the functional structure of fish assemblages in Amazon streams. **Ecography**, v. 41, n. 1, p. 219–232, jan. 2018.

LI, F. *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals the impact of different land use on multitrophic biodiversity in riverine systems. **Science of the Total Environment**, v. 855, 2023.

LI, Zhen *et al.* Environmental DNA biomonitoring reveals the human impacts on native and non-native fish communities in subtropical river systems. **Journal of Environmental Management**, v. 349, p. 119595, jan. 2024.

LODGE, David M. *et al.* Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 11, p. 2555–2558, jun. 2012.

MACDONALD, Anna J. *et al.* Primers for detection of Macquarie perch from environmental and trace DNA samples. **Conservation Genetics Resources**, v. 6, n. 3, p. 551–553, set. 2014.

MAGALHÃES, André Lincoln Barroso; JACOBI, Claudia Maria. Colorful invasion in permissive Neotropical ecosystems: establishment of ornamental non-native poeciliids of the genera *Poecilia*/*Xiphophorus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) and management alternatives. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, 2017.

MAGURRAN, Anne E. **Measuring biological diversity**. 9 [Nachdr.] ed. Malden, Mass.: Blackwell, 2004.

MAIOLI, Otávio L. G. *et al.* Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1543–1551, 2010.

MANTUA, Nathan J. *et al.* A Pacific Interdecadal Climate Oscillation with Impacts on Salmon Production. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 78, n. 6, p. 1069–1079, jun. 1997.

MARQUES, José Geraldo Wanderley; SAZIMA, Ivan; CAMPINAS, Universidade Estadual de. **Aspectos ecologicos na etnoictiologia dos pescadores do complexo estuarino-lagunar Mandau-Manguaba, Alagoas**. [S.l.]: [s.n.], 1991. Disponível em: <<https://www.repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/35266?guid=1675283072484&returnUrl=%2fresultado%2flistar%3fguid%3d1675283072484%26quantidadePaginas%3d1%26codigoRegistro%3d35266%2335266&i=1>>. Acesso em: 2 fev. 2023.

MCDEVITT, Allan D. *et al.* Environmental DNA metabarcoding as an effective and rapid tool for fish monitoring in canals. **Journal of Fish Biology**, v. 95, n. 2, p. 679–682, ago. 2019.

MEDEIROS, Amanda Silva de *et al.* Anthropogenic interference in mangrove areas of the Mundaú-Manguaba estuarine lagoon complex (CELMM), Alagoas (Brazil) as a case study. **Ciência Rural**, v. 50, n. 10, p. e20200356, 2020.

MELO-MAGALHÃES, Em. *et al.* Determination of eutrophic areas in Mundaú/Manguaba lagoons, Alagoas-Brazil, through studies of the phytoplanktonic community. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 271–280, maio 2009.

MENDES DE BRITO, Gabriel Antônio. **Emprego do eDNA metabarcoding na investigação da biodiversidade de peixes de um reservatório urbano**. Dissertação—MG, Brasil: Universidade Federal de Minas Gerais, 22 mar. 2024.

MILAN, David T. *et al.* New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17966, 21 out. 2020.

MILHAU, Tristan *et al.* Seasonal dynamics of riverine fish communities using eDNA. **Journal of Fish Biology**, v. 98, n. 2, p. 387–398, fev. 2021.

MIYA, M. *et al.* MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. **Royal Society Open Science**, v. 2, n. 7, p. 150088, jul. 2015.

MIYA, Masaki; GOTOH, Ryo O.; SADO, Tetsuya. MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. **Fisheries Science**, v. 86, n. 6, p. 939–970, nov. 2020.

MONTAG, Luciano F. A. *et al.* Land cover, riparian zones and instream habitat influence stream fish assemblages in the eastern Amazon. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 28, n. 2, p. 317–329, abr. 2019.

MONTICINI, Pierluigi. **The ornamental fish trade: production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects**: GLOBEFISH Research Programme. Rome: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. Disponível em: <<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/b02939ef-3536-4e8e-be33-2524d8452738/content>>.

MOREIRA, Elto Aparecido; SILVA, Daniel De Paiva. Uma dúzia de peixes: algumas espécies exóticas invasoras encontradas em águas brasileiras e seus impactos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 24, p. e-74647E, 2023.

MORENO, Claudia E. **Métodos para medir la biodiversidad**. 1st. ed. Zaragoza, España: M&T–Manuales y Tesis SEA, 2001. v. 1

MUFF, Stefanie *et al.* Rewriting results sections in the language of evidence. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 37, n. 3, p. 203–210, mar. 2022.

OKSANEN, Jari *et al.* **vegan: Community Ecology Package**. , 2025. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. Acesso em: 19 fev. 2025

PAWLOWSKI, Jan *et al.* Environmental DNA for biomonitoring. **Molecular Ecology**, v. 30, n. 13, p. 2931–2936, 2021.

PECK, D. V. *et al.* **Environmental Monitoring and Assessment Program-Surface Waters Western Pilot Study: Field Operations Manual for Wadeable Streams.** U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development ed. Washington, D.C.: [S.n.].

PEREIRA FILHO, Gentil Alves *et al.* (ORGS.). **Animal Biodiversity and Conservation in Brazil's Northern Atlantic Forest.** Cham: Springer International Publishing, 2023.

POLANCO F., Andrea *et al.* Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems. **Environmental DNA**, v. 3, n. 6, p. 1113–1127, 2021.

PONT, Didier *et al.* Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. **Molecular Ecology Resources**, v. 23, n. 2, p. 396–409, fev. 2023.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2024. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>

REEVES, G. H. *et al.* A Disturbance-Based Ecosystem Approach to Maintaining and Restoring Freshwater Habitats of Evolutionarily Significant Units of Anadromous Salmonids in the Pacific Northwest. **American Fisheries Society Symposium**, v. 17, p. 334–349, 1995.

RIAZ, Tiayyba *et al.* ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 21, p. e145–e145, 1 nov. 2011.

ROA-FUENTES, Camilo A. *et al.* Importance of local and landscape variables on multiple facets of stream fish biodiversity in a Neotropical agroecosystem. **Hydrobiologia**, v. 849, n. 20, p. 4447–4464, 1 nov. 2022.

ROSA, Ricardo de Souza *et al.* Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da caatinga. **Ecologia e conservação da caatinga**, 2003.

ROURKE, Meaghan L. *et al.* Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. **Environmental DNA**, v. 4, n. 1, p. 9–33, 2022.

RUAN, Hui-Ting *et al.* Effects of sampling strategies and DNA extraction methods on eDNA metabarcoding: A case study of estuarine fish diversity monitoring. **Zoological Research**, v. 43, n. 2, p. 192–204, 2022.

RUPPERT, Krista M.; KLINE, Richard J.; RAHMAN, Md Saydur. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. **Global Ecology and Conservation**, v. 17, p. e00547, jan. 2019.

SAKATA, Masayuki K. *et al.* Determining an effective sampling method for eDNA metabarcoding: a case study for fish biodiversity monitoring in a small, natural river. **Limnology**, v. 22, n. 2, p. 221–235, abr. 2021.

SALES, Naiara G. *et al.* Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. **Environmental DNA**, v. 1, n. 2, p. edn3.14, jul. 2019.

SALES, Naiara Guimarães. **Barcoding and eDNA metabarcoding of a rapidly changing Neotropical freshwater fish community**. Thesis—Manchester: University of Salford, mar. 2019.

SALES, Naiara Guimarães *et al.* Space-time dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding. **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 142096, 1 fev. 2021.

SANTOS, Everson Cardoso dos; SAMPAIO, Cláudio Luis Santos. A Pesca Artesanal na Comunidade de Fernão Velho, Maceió (Alagoas, Brasil): de Tradicional a Marginal. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 13, n. 4, p. 413–424, dez. 2013.

SARANHOLI, Bruno H. *et al.* Comparing iDNA from mosquitoes and flies to survey mammals in a semi-controlled Neotropical area. **Molecular Ecology Resources**, v. 23, n. 8, p. 1790–1799, nov. 2023.

SARANHOLI, Bruno H. *et al.* Testing and optimizing metabarcoding of iDNA from dung beetles to sample mammals in the hyperdiverse Neotropics. **Molecular Ecology Resources**, v. 24, n. 5, p. e13961, jul. 2024.

SEABRA, Lidia Brasil; BENONE, Naraiana Loureiro; MONTAG, Luciano Fogaça de Assis. Assessing the effects of multiple land uses on the functional beta diversity of stream fishes in the Amazon region. **Hydrobiologia**, v. 849, n. 20, p. 4515–4527, nov. 2022.

SHIBATTA, Oscar A. *et al.* Phylogeny of the Neotropical Pacman catfish genus *Lophiosilurus* (Siluriformes: Pseudopimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 4, p. e210040, 2021.

SHU, Lu; LUDWIG, Arne; PENG, Zuogang. Standards for Methods Utilizing Environmental DNA for Detection of Fish Species. **Genes**, v. 11, n. 3, p. 296, 11 mar. 2020.

STOECKLE, Mark Y.; SOBOLEVA, Lyubov; CHARLOP-POWERS, Zachary. Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175186, 12 abr. 2017.

TAKAHARA, Teruhiko *et al.* Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35868, 26 abr. 2012.

TEIXEIRA, Daniel Fonseca *et al.* DNA metabarcoding assessment of Neotropical ichthyoplankton communities is marker-dependent. **Ecology and Evolution**, v. 13, n. 10, p. e10649, 2023.

TEIXEIRA, Francisco Keilo *et al.* Ichthyofauna of Mundaú river basin, Ceará State, Northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 1, 2017.

THOMSEN, Philip Francis; WILLERSLEV, Eske. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological Conservation**, v. 183, p. 4–18, mar. 2015.

TIBÚRCIO, Gabriela Santos *et al.* Landscape effects on the occurrence of ichthyofauna in first-order streams of southeastern Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 28, n. 0, 2016.

TIMANA-MENDOZA, Camila *et al.* Assessing fish diversity in abandoned mining ponds in Madre de Dios, Peru, using environmental DNA. **Environmental DNA**, v. 6, n. 1, p. e520, jan. 2024.

TORGERSEN, Christian E. *et al.* Riverscape approaches in practice: perspectives and applications. **Biological Reviews**, v. 97, n. 2, p. 481–504, abr. 2022.

URBAN, P. *et al.* Scaling from eDNA to biomass: controlling allometric relationships improves precision in bycatch estimation. **ICES Journal of Marine Science**, v. 80, n. 4, p. 1066–1078, 18 maio 2023.

USHIO, Masayuki *et al.* Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 2, p. e23297, 14 mar. 2018.

VALENTINI, Alice *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 4, p. 929–942, fev. 2016.

VAN BLEIJSWIJK, Judith D. L. *et al.* Analysis of a coastal North Sea fish community: Comparison of aquatic environmental DNA concentrations to fish catches. **Environmental DNA**, v. 2, n. 4, p. 429–445, 2020.

WANG, Shuping *et al.* Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. **Science of the Total Environment**, v. 755, p. 142622, 10 fev. 2021.

WRIGHT, Justin P.; FLECKER, Alexander S. Deforesting the riverscape: the effects of wood on fish diversity in a Venezuelan piedmont stream. **Biological Conservation**, v. 120, n. 3, p. 439–447, dez. 2004.

XU, Xuming *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals the impacts of anthropogenic pollution on multitrophic aquatic communities across an urban river of western China. **Environmental Research**, v. 216, p. 114512, 1 jan. 2023.

YOSHITAKE, Kazutoshi *et al.* Pilot study of a comprehensive resource estimation method from environmental DNA using universal D-loop amplification primers. **Functional & Integrative Genomics**, v. 23, n. 2, p. 96, jun. 2023.

ZAINAL ABIDIN, D. H. *et al.* Assessing a megadiverse but poorly known community of fishes in a tropical mangrove estuary through environmental DNA (eDNA) metabarcoding. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

ZAMBALDI, Ludimilla; POMPEU, Paulo Santos. Evaluation of River Fragmentation and Implications for the Conservation of Migratory Fish in Southeastern Brazil. **Environmental Management**, v. 65, n. 5, p. 702–709, maio 2020.

ZAR, Jerrold H. **Biostatistical analysis**. 5th ed ed. New Jersey, USA: Pearson Prentice Hall, 2010.

ZHANG, Jiajie *et al.* PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614–620, 1 mar. 2014.

ZHU, Mengyao *et al.* Comparison of fish fauna evaluated using aqueous eDNA, sedimentary eDNA, and catch surveys in Tokyo Bay, Central Japan. **Journal of Marine Systems**, p. 103886, mar. 2023a.

ZHU, Tao *et al.* MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: Updates in 10 Years. **Molecular Biology and Evolution**, v. 40, n. 3, p. msad035, 4 mar. 2023b.

10 APÊNDICES

Apêndice 1 - Dados das variáveis ambientais locais e métricas de paisagem dos pontos de amostragem na Bacia do Rio Mundaú.

Ponto	F1	F2	F3	F4	F5	F6	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Floresta Buffer	0.992	0.966	0.872	0.980	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-
Lavoura Buffer	-	0.034	0.015	-	-	-	0.870	1.000	0.515	0.865	1.000	0.991
Pecuária Buffer	0.008	-	-	0.020	-	-	0.130	-	0.485	0.135	-	0.009
Urbana Buffer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Floresta Drenagem	0.836	0.802	0.600	0.438	0.964	1.000	0.002	-	0.031	0.146	0.032	0.103
Lavoura Drenagem	0.070	0.069	0.088	0.000	-	-	0.510	0.886	0.635	0.717	0.868	0.860
Pecuária Drenagem	0.087	0.129	0.312	0.562	0.036	-	0.488	0.114	0.334	0.137	0.100	0.032
Urbana Drenagem	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.005
Caudal	0.313	0.042	0.029	0.140	0.049	0.006	0.071	0.000	0.001	0.009	0.642	0.053
Velocidade Media	0.413	0.390	0.070	0.937	0.166	0.096	0.513	0.047	0.054	0.433	0.309	0.348
Profundidade Media	0.45	0.17	0.1	0.31	0.18	0.09	0.09	0.06	0.07	0.05	0.3	0.08
Profundidade DesvioP	0.180	0.130	0.043	0.219	0.089	0.042	0.029	0.058	0.064	0.020	0.130	0.032
Largura Media	1.56	1.90	2.35	3.46	1.74	1.14	1.41	1.31	1.10	0.49	10.00	2.08
Substrato Fino	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Substrato Areia	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
Substrato Grava	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
Substrato Cobble	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Substrato Boulder	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1
Substrato Rocha Matriz	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Substrato Tronco	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
Substrato Ramas	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Substrato Serrapilheira	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Substrato Plantas aq	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Substrato Algas Fil	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Vegetação Arbórea	1	3	3	4	4	4	0	0	0	0	0	0
Vegetação Arbustiva	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Vegetação Herbácea	3	3	2	1	1	1	4	3	2	1	3	2
Glide	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pools	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rapids	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
Cascades	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Falls	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Area Drenagem km2	6.043	5.505	8.304	7.609	1.848	0.397	3.974	1.449	6.332	6.960	4.612	6.356
Ordem Strahler	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2

(continuação)

Ponto	P1	P2	P3	P4	P5	P6	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Floresta Buffer	-	0.007	-	0.023	-	-	-	0.451	-	0.170	0.192	-
Lavoura Buffer	-	0.001	-	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-
Pecuária Buffer	1.000	0.993	1.000	0.976	1.000	1.000	0.314	0.386	-	0.462	0.430	0.195
Urbana Buffer	-	-	-	-	-	-	0.686	0.162	1.000	0.368	0.379	0.805
Floresta Drenagem	0.215	0.050	0.130	0.039	0.064	0.001	0.081	0.228	-	0.173	0.458	-
Lavoura Drenagem	0.000	-	0.008	0.004	0.013	-	0.001	-	-	0.000	0.153	-
Pecuária Drenagem	0.785	0.950	0.424	0.957	0.910	0.999	0.757	0.765	-	0.821	0.251	0.034
Urbana Drenagem	0.000	-	0.437	0.000	0.013	-	0.161	0.007	1.000	0.006	0.138	0.966
Caudal	0.050	0.025	0.023	0.046	0.323	0.068	0.576	0.028	0.103	0.554	0.021	0.048
Velocidade Media	0.031	0.109	0.039	0.169	0.448	0.115	0.544	0.367	0.545	0.639	0.365	0.241
Profundidade Media	0.67	0.14	0.18	0.22	0.15	0.25	0.34	0.06	0.08	0.18	0.04	0.15
Profundidade DesvioP	0.263	0.033	0.090	0.139	0.103	0.157	0.089	0.035	0.029	0.045	0.016	0.038
Largura Media	4.04	1.84	1.96	3.38	2.52	2.84	3.32	1.10	2.62	5.32	1.20	1.26
Substrato Fino	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Substrato Areia	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
Substrato Grava	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Substrato Cobble	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
Substrato Boulder	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
Substrato Rocha Matriz	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Substrato Tronco	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
Substrato Ramas	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Substrato Serrapilheira	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
Substrato Plantas aq	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Substrato Algas Fil	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Vegetação Arbórea	0	1	2	0	0	0	2	2	0	2	4	1
Vegetação Arbustiva	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0
Vegetação Herbácea	4	4	3	4	4	4	4	4	1	3	2	4
Glide	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pools	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rapids	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
Cascades	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Falls	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Area Drenagem km2	32.458	7.509	19.875	4.261	4.298	1.626	27.120	1.818	2.138	58.211	5.297	0.720
Ordem Strahler	3	2	3	2	2	2	3	2	2	3	2	1

Apêndice 3 - Lista de espécies de peixes de água doce registradas para a ecorregião da Caatinga do Meio-Norte e para o Nordeste do Brasil, utilizada como referência para atribuição taxonômica neste estudo.

Táxon (Ordem/Família/Espécie)	Berbel-Filho et al. (2018)	Pereira Filho et al. (2023)	Sequência 12S (GenBank)	Nota taxonômica - Eschmeyer's Catalog of Fishes (2025)
Characiformes				
Acestrorhamphidae				
<i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i>	✓		✓	
<i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i>	✓		✓	
<i>Astyanax</i> cf. <i>bimaculatus</i>		✓	✓	
<i>Ctenobrycon spilurus</i>	✓			
<i>Hemigrammus brevis</i>	✓			
<i>Hemigrammus guyanensis</i>	✓			Valid as <i>Holopristis guyanensis</i> (Géry 1959)
<i>Hemigrammus marginatus</i>	✓	✓	✓	
<i>Hemigrammus rodwayi</i>	✓	✓		
<i>Hemigrammus unilineatus</i>	✓	✓	✓	
<i>Hyphessobrycon bentosi</i>	✓			Valid as <i>Megalampodus bentosi</i> (Durbin 1908)
<i>Hyphessobrycon</i> cf. <i>piabinhas</i>		✓		
<i>Hyphessobrycon parvellus</i>	✓			
<i>Hyphessobrycon piabinhas</i>	✓			
<i>Moenkhausia costae</i>	✓		✓	
<i>Moenkhausia intermedia</i>	✓		✓	
<i>Moenkhausia lepidura</i>	✓		✓	
<i>Psalidodon</i> cf. <i>fasciatus</i>		✓	✓	
<i>Psellogrammus kennedyi</i>		✓		Valid as <i>Ctenobrycon kennedyi</i> (Eigenmann 1903)
Anostomidae				
<i>Leporinus melanopleura</i>	✓			
<i>Leporinus piau</i>	✓	✓	✓	
<i>Leporinus taeniatus</i>	✓		✓	
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	✓		✓	
<i>Schizodon fasciatus</i>	✓		✓	
Bryconidae				
<i>Salminus hilarii</i>	✓		✓	
Characidae				
<i>Cheirodon jaguaribensis</i>	✓	✓		
<i>Cheirodon macropterus</i>	✓			
<i>Compsura heterura</i>	✓	✓	✓	
<i>Hyphessobrycon iheringi</i>	✓			Synonym of <i>Serrapinnus piaba</i> (Lütken 1875)
<i>Nanocheirodon insignis</i>	✓			
<i>Phenacogaster calverti</i>	✓		✓	
<i>Roeboides microlepis</i>	✓			
<i>Serrapinnus heterodon</i>	✓	✓	✓	
<i>Serrapinnus piaba</i>	✓	✓	✓	
<i>Serrapinnus potiguar</i>	✓	✓		
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	✓		✓	

Táxon (Ordem/Família/Espécie)	Berbel-Filho et al. (2018)	Pereira Filho et al. (2023)	Sequência 12S (GenBank)	Nota taxonômica - Eschmeyer's Catalog of Fishes (2025)
Crenuchidae				
<i>Characidium bimaculatum</i>	✓	✓		
Curimatidae				
<i>Curimatella lepidura</i>	✓		✓	
<i>Psectrogaster rhomboides</i>	✓			
<i>Psectrogaster saguiru</i>	✓	✓		
<i>Steindachnerina notonota</i>	✓	✓		
Erythrinidae				
<i>Erythrinus erythrinus</i>	✓	✓	✓	
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	✓	✓	✓	
<i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i>	✓		✓	
<i>Hoplias</i> cf. <i>malabaricus</i>		✓	✓	
Hemiodontidae				
<i>Hemiodus parnaguae</i>	✓			
Lebiasinidae				
<i>Nannostomus beckfordi</i>	✓	✓		
Parodontidae				
<i>Apareiodon davisii</i>	✓	✓		
Prochilodontidae				
<i>Prochilodus brevis</i>	✓	✓		
Serrasalminidae				
<i>Colossoma macropomum</i>	✓		✓	
<i>Metynnis lippincottianus</i>	✓	✓	✓	
<i>Myleus micans</i>	✓	✓	✓	
<i>Pristobrycon striolatus</i>	✓		✓	Synonym of <i>Serrasalmus scapularis</i> Günther 1864
<i>Pygocentrus nattereri</i>	✓		✓	
<i>Pygocentrus piraya</i>	✓		✓	
<i>Serrasalmus brandtii</i>	✓	✓	✓	
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	✓	✓	✓	
<i>Serrasalmus spilopleura</i>	✓	✓	✓	
Triporthidae				
<i>Triporthus signatus</i>	✓	✓		
Cichliformes				
Cichlidae				
<i>Astronotus ocellatus</i>	✓	✓	✓	
<i>Cichla kelberi</i>	✓		✓	
<i>Cichla monoculus</i>	✓	✓	✓	
<i>Cichla ocellaris</i>	✓		✓	
<i>Cichlasoma orientale</i>	✓	✓		
<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	✓	✓	✓	
<i>Coptodon rendalli</i>	✓	✓	✓	
<i>Crenicichla brasiliensis</i>		✓		Valid as <i>Saxatilia brasiliensis</i> (Bloch 1792)
<i>Crenicichla menezesi</i>	✓			Synonym of <i>Saxatilia brasiliensis</i> (Bloch 1792)
<i>Geophagus brasiliensis</i>	✓	✓	✓	

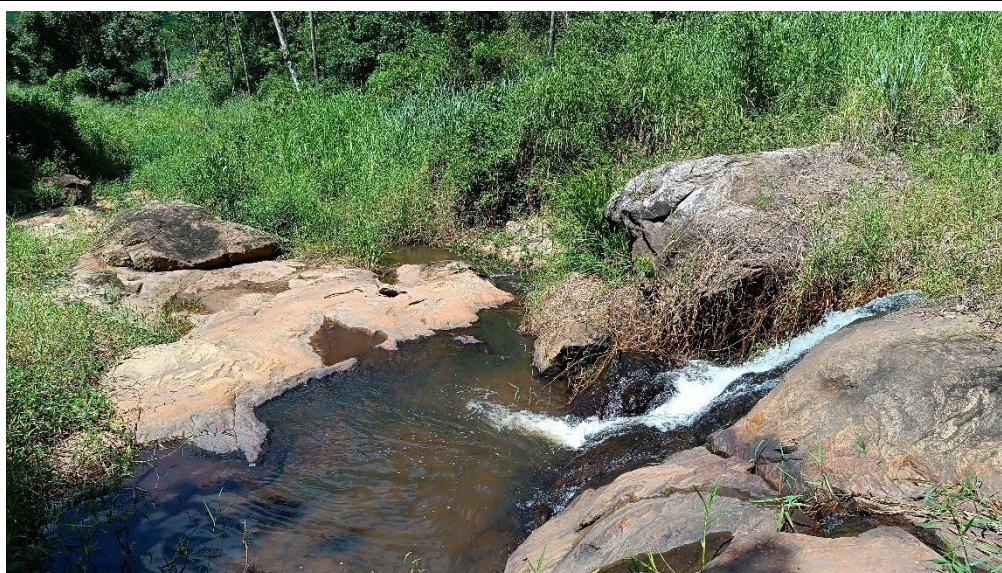
Táxon (Ordem/Família/Espécie)	Berbel-Filho et al. (2018)	Pereira Filho et al. (2023)	Sequência 12S (GenBank)	Nota taxonômica - Eschmeyer's Catalog of Fishes (2025)
Cichlidae				
<i>Laetacara curviceps</i>	✓	✓	✓	
<i>Oreochromis niloticus</i>	✓	✓	✓	
<i>Parachromis managuensis</i>	✓	✓	✓	
Cyprinodontiformes				
Poeciliidae				
<i>Poecilia hollandi</i>		✓	✓	
<i>Poecilia reticulata</i>	✓	✓	✓	
<i>Poecilia sarrafae</i>	✓			
<i>Poecilia vivipara</i>	✓	✓		
<i>Xiphophorus cf. helleri</i>	✓		✓	
<i>Xiphophorus maculatus</i>		✓	✓	
Rivulidae				
<i>Anablepsoides cearensis</i>	✓			
<i>Cynolebias microphthalmus</i>	✓			
<i>Hypsolebias antenori</i>	✓		✓	
<i>Hypsolebias longignatus</i>	✓			
<i>Hypsolebias martinsi</i>	✓			
<i>Kryptolebias hermaphroditus</i>	✓		✓	
<i>Kryptolebias ocellatus</i>		✓	✓	
Gymnotiformes				
Gymnotidae				
<i>Gymnotus carapo</i>	✓		✓	
<i>Gymnotus cf. carapo</i>		✓	✓	
<i>Gymnotus darwini</i>		✓		
Sternopygidae				
<i>Eigenmannia virescens</i>	✓		✓	
Osteoglossiformes				
Arapaimidae				
<i>Arapaima gigas</i>	✓		✓	
Siluriformes				
Auchenipteridae				
<i>Trachelyopterus cratensis</i>	✓			
<i>Trachelyopterus galeatus</i>	✓	✓	✓	
<i>Trachelyopterus striatulus</i>	✓		✓	
Callichthyidae				
<i>Aspidoras carvalhoi</i>	✓			
<i>Aspidoras depinnai</i>	✓	✓	✓	
<i>Aspidoras menezesi</i>	✓		✓	Synonym of <i>Aspidoras raimundi</i> (Steindachner 1907)
<i>Aspidoras rochai</i>	✓			
<i>Aspidoras spilodus</i>	✓		✓	Synonym of <i>Aspidoras raimundi</i> (Steindachner 1907)
<i>Callichthys callichthys</i>	✓	✓	✓	
<i>Corydoras sp.</i>	✓		✓	

Táxon (Ordem/Família/Espécie)	Berbel-Filho et al. (2018)	Pereira Filho et al. (2023)	Sequência 12S (GenBank)	Nota taxonômica - Eschmeyer's Catalog of Fishes (2025)
Callichthyidae				
<i>Megalechis personata</i>	✓		✓	Synonym of <i>Megalechis thoracata</i> (Valenciennes 1840)
<i>Megalechis thoracata</i>	✓	✓	✓	
Heptapteridae				
<i>Pimelodella dorseyi</i>	✓			
<i>Pimelodella enochi</i>	✓			
<i>Pimelodella gracilis</i>	✓		✓	
<i>Pimelodella papariae</i>	✓	✓		
<i>Pimelodella witmeri</i>	✓			
<i>Pimelodella wolffi</i>	✓			
<i>Rhamdia quelen</i>	✓	✓	✓	
Loricariidae				
<i>Aphanotorulus gomesi</i>	✓			
<i>Hypostomus carvalhoi</i>	✓			Synonym of <i>Hypostomus puseurum</i> (Starks 1913)
<i>Hypostomus jaguribensis</i>	✓			Synonym of <i>Hypostomus puseurum</i> (Starks 1913)
<i>Hypostomus nudiventris</i>	✓			Synonym of <i>Hypostomus puseurum</i> (Starks 1913)
<i>Hypostomus papariae</i>	✓	✓		Synonym of <i>Hypostomus puseurum</i> (Starks 1913)
<i>Hypostomus puseurum</i>	✓	✓		
<i>Hypostomus salgadae</i>	✓			Synonym of <i>Hypostomus puseurum</i> (Starks 1913)
<i>Hypostomus sertanejo</i>	✓			
<i>Loricariichthys derbyi</i>	✓		✓	
<i>Loricariichthys</i> sp.	✓		✓	
<i>Parotocinclus cearensis</i>	✓			
<i>Parotocinclus cesarpintoi</i>	✓	✓		
<i>Parotocinclus haroldoi</i>	✓			
<i>Parotocinclus jumbo</i>	✓	✓		
<i>Parotocinclus seridoensis</i>	✓			
<i>Parotocinclus</i> sp. 1	✓		✓	
<i>Parotocinclus</i> sp. 2	✓		✓	
<i>Parotocinclus spilosoma</i>	✓	✓		
<i>Parotocinclus spilurus</i>	✓			
<i>Pseudancistrus genisetiger</i>	✓		✓	
<i>Pseudancistrus papariae</i>	✓	✓		
Synbranchiformes				
Synbranchidae				
<i>Synbranchus</i> aff. <i>marmoratus</i>		✓	✓	
<i>Synbranchus</i> sp.	✓		✓	
Total	131	119	58	72
				15

Apêndice 4 - Ponto F1: Área de Floresta – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 5 - Ponto F2: Área de Floresta – Bacia do Rio Mundaú



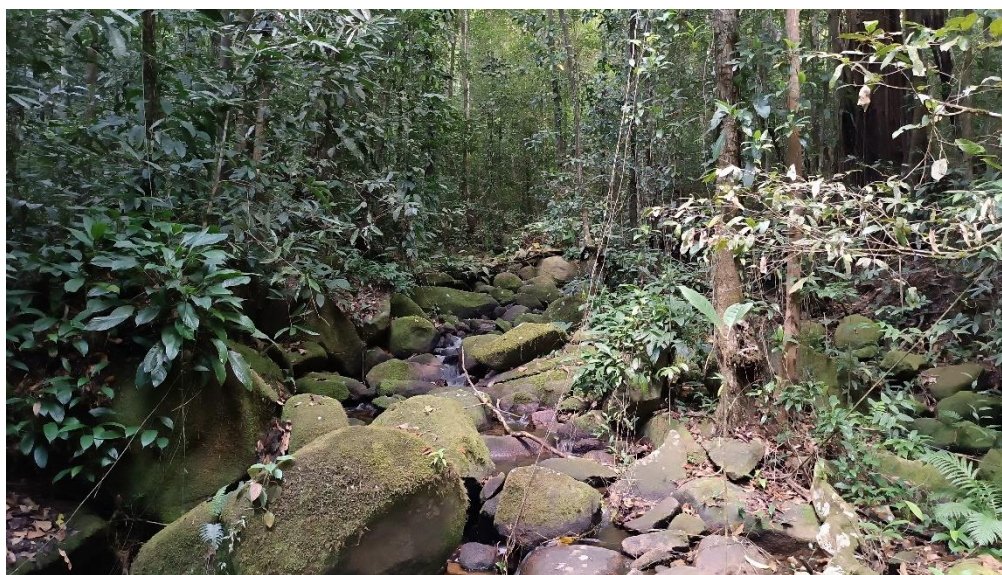
Apêndice 6 - Ponto F3: Área de Floresta – Bacia do Rio Mundaú



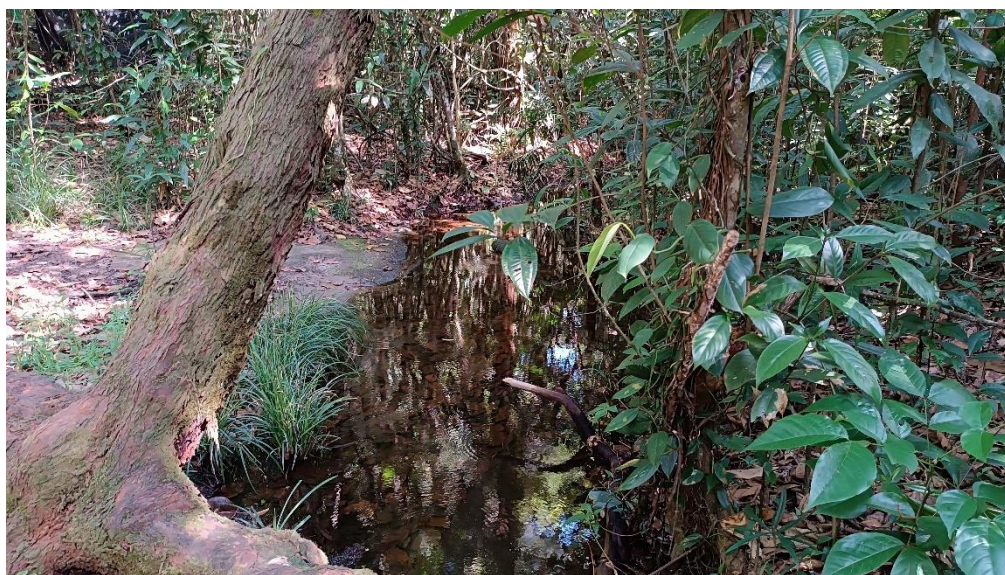
Apêndice 7 - Ponto F4: Área de Floresta – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 8 - Ponto F5: Área de Floresta – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 9 - Ponto F6: Área de Floresta – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 10 - Ponto L1: Área de Lavoura – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 11 - Ponto L2: Área de Lavoura – Bacia do Rio Mundaú



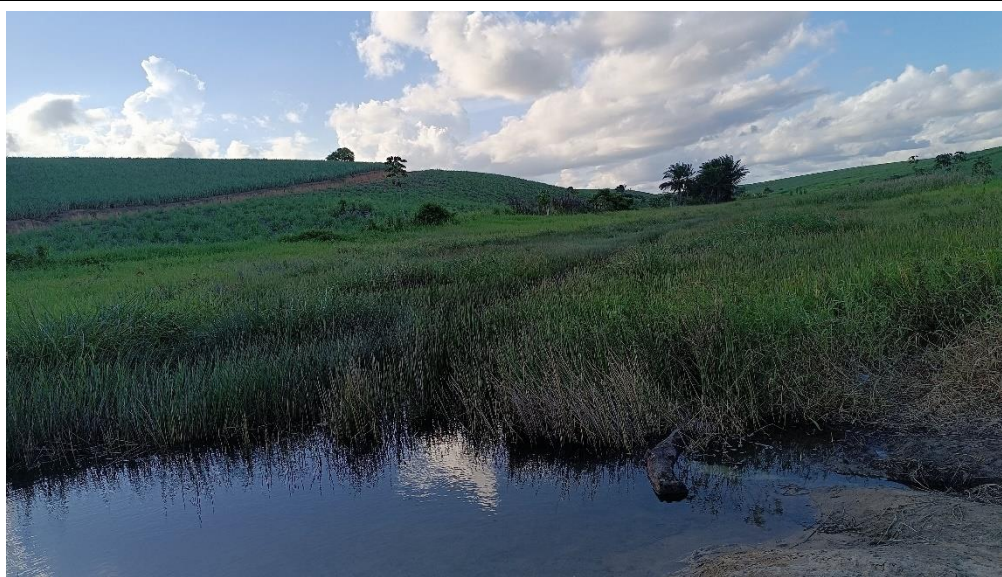
Apêndice 12 - Ponto L3: Área de Lavoura – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 13 - Ponto L4: Área de Lavoura – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 14 - Ponto L5: Área de Lavoura – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 15 - Ponto L6: Área de Lavoura – Bacia do Rio Mundaú



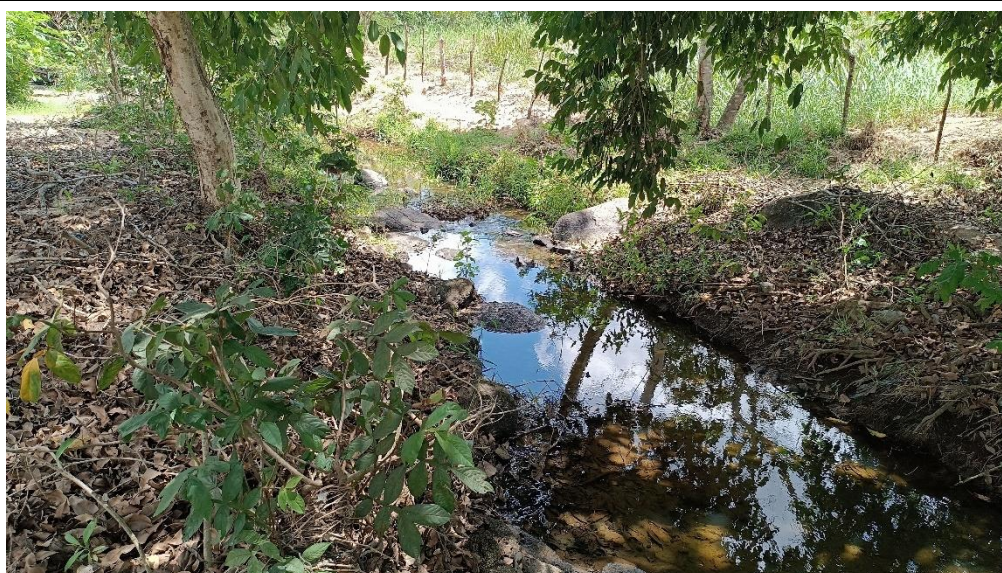
Apêndice 16 - Ponto P1: Área de Pecuária – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 17 - Ponto P2: Área de Pecuária – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 18 - Ponto P3: Área de Pecuária – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 19 -

Ponto P4: Área de Pecuária – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 20 - Ponto P5: Área de Pecuária – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 21 - Ponto P6: Área de Pecuária – Bacia do Rio Mundaú



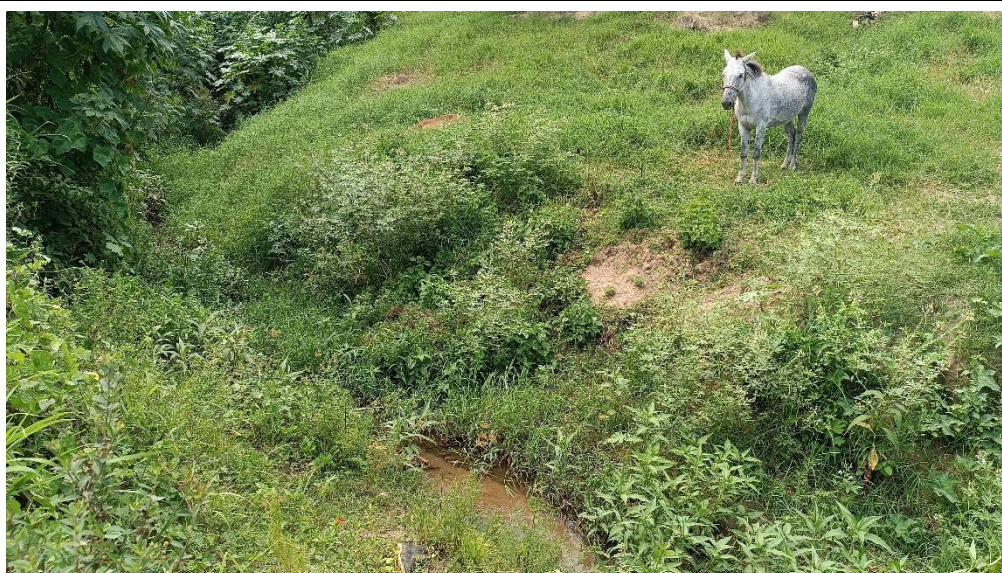
Apêndice 22 -

Ponto U1: Área Urbana – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 23 -

Ponto U2: Área Urbana – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 24 -

Ponto U3: Área Urbana – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 25 -

Ponto U4: Área Urbana – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 26 - Ponto U5: Área Urbana – Bacia do Rio Mundaú



Apêndice 27 -

Ponto U6: Área Urbana – Bacia do Rio Mundaú

