

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Thiago Marques Salgueiro

IMPACTO DA ÁREA URBANA DE DIAMANTINA NA INTEGRIDADE
AMBIENTAL E BIOTA DO CÓRREGO DA PALHA

Diamantina
2020

Thiago Marques Salgueiro

**IMPACTO DA ÁREA URBANA DE DIAMANTINA NA INTEGRIDADE
AMBIENTAL E BIOTA DO CÓRREGO DA PALHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biodiversidade

Orientador: Alex Sander Dias Machado

**Diamantina
2020**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S164i	<p>Salgueiro, Thiago Marques Impacto da área urbana de Diamantina na integridade ambiental e biota do córrego da Palha / Thiago Marques Salgueiro, 2020. 79 p.:il.</p> <p>Orientador: Alex Sander Dias Machado</p> <p>Dissertação (Mestrado– Programa de Pós Graduação em Biologia Animal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.</p> <p>1. Bioindicadores. 2. Rio urbano. 3. Efluente urbano. 4. Qualidade ambiental. 5. Poluição urbana. 6. Fauna aquática. I. Machado, Alex Sander Dias. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p>
CDD 631.7063	

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

THIAGO MARQUES SALGUEIRO

IMPACTO DA ÁREA URBANA DE DIAMANTINA NA INTEGRIDADE AMBIENTAL E BIOTA DO CÔRREGO DA PALHA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível de Mestrado, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biologia Animal**.

Orientador: Prof. Alex Sander Dias Machado

Data de aprovação 26/11/2020.

Prof.Dr. ALEX SANDER DIAS MACHADO - UFVJM

Prof.Dr.ª MARCIA REGINA SPIES - UNIPAMPA

Prof.Dr. JOSÉ ROBERTO KFOURY JUNIOR - USP



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Kfoury Jr, Usuário Externo**, em 04/12/2020, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcia Regina Spies, Usuário Externo**, em 04/12/2020, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alex Sander Dias Machado, Servidor**, em 15/12/2020, às 18:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0233715** e o código CRC **3660200B**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Alex Sander Dias Machado pela oportunidade, acolhimento, amizade, ensinamentos transmitidos e toda confiança depositada. Obrigado pelos conselhos, por compartilhar de sua bagagem e por sempre nos lembrar que devemos olhar com amor e ternura para o mundo em nossa volta. Gratidão.

Agradeço imensamente a profa. Marcia Spies por todo o incentivo, apoio e auxílio com os dados e ensinamentos antes e durante o mestrado. E claro, por me mostrar e me fazer apaixonar pelo mundo dos insetos aquáticos, incentivando e mesmo indicando e ajudando na ida em eventos.

Aos meus pais, Vilma e José Geraldo, por moldarem meu chão, estarem ao meu lado e ofertar suporte independentemente das minhas escolhas. Minha irmã Alinne e meu cunhado Adolfo pelo apoio incondicional e carinho. Minha sobrinha Cecília por ser luz nas nossas vidas.

Ao meu irmão de vida Marsal Danrlei de Amorim pela grata companhia no dia-a-dia e pelo auxílio na vida pessoal e acadêmica.

Minhas grandes amigas Letícia de Melo Vitorino, Paula Mariana Munno, Heloísa Helena de Aguiar que me acompanharam e auxiliaram de infinitas formas durante todo este mestrado, o meu mais sincero obrigado. Serei eternamente grato pela amizade, acolhimento, pelas risadas e a mão estendida nos meus momentos mais nublados. Aprendi muito com vocês e quero levar nossa amizade para a vida toda!

Aos meus amigos Pedro Pinto Godoy, sempre disposto a auxiliar com textos e nos animar durante as coletas, Emerson pela amizade e boas conversas no laboratório, e Bernardo Monteiro por todo ensinamento e experiência transmitida.

À turma de 2018 do PPGBA, com a qual pude compartilhar momentos e fases importantes na vida de todos nós.

Ao Núcleo de Experimentação Animal pela realização de boa parte laboratorial do trabalho, e a técnica Natália de Tartler por todo auxílio durante as técnicas.

Ao LABESE, em nome do Prof. Thiago Santos e a técnica Renata Ursine por todo carinho, acolhimento e disponibilidade em auxiliar com dúvidas ou suporte material durante a triagem dos macroinvertebrados.

Ao Laboratório de Bioprocessos, Profa. Valéria e as técnicas Patrícia e Mércia por permitirem e auxiliarem a realização das análises microbiológicas.

À UFVJM e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (Profs. Thiago e Leonardo Lessa), pela possibilidade de realização deste trabalho e experiência adquirida.

À Diamantina e ao Córrego da Palha. Há muita história e muita vida aqui pulsando.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O crescimento urbano das últimas décadas tem reduzido a qualidade ambiental de rios urbanos, afetando negativamente a biodiversidade local. A principal causa desse desequilíbrio é o lançamento de efluentes sem tratamentos. Em Diamantina-MG, cerca de 62% dos domicílios despejam esgoto diretamente no Córrego da Palha. O objetivo desse estudo foi avaliar a integridade ambiental do Córrego da Palha. Foram amostrados seis pontos ao longo do córrego e um ponto adicional adotado como referência no Córrego Formação, local com mínima influência antrópica. Para caracterizar o ambiente foi aplicado o Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats (PARDH) e os parâmetros físico-químicos mensurados. A presença de coliformes totais e termotolerantes, em quatro pontos amostrais, foi verificada pela técnica de Número Mais Provável. Foi feito o levantamento e avaliação da comunidade de macroinvertebrados bentônicos. Peixes foram coletados e suas brânquias analisadas pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Imuno-histoquímica (IHQ), para verificar a presença de histopatologias e a expressão de HSP70, respectivamente. Enquanto os escores do PARDH e o oxigênio dissolvido foram menores nos pontos urbanos, o pH foi maior, refletindo a urbanização no entorno. O ponto à montante da área urbana apresentou carga baixa de coliformes totais e termotolerantes, diferentemente dos pontos urbanos e à jusante que obtiveram valores máximos. Os macroinvertebrados apresentaram baixa diversidade nos pontos urbanos e à jusante, com dominância da família Chironomidae. Táxons mais sensíveis foram encontrados apenas nos pontos distantes da urbanização. A ordenação espacial indicou dois grupos de comunidade, sendo um composto pelo trecho referencial e o ponto à montante da área urbana e outro pelos pontos com maior influência urbana. Os índices bióticos classificaram os pontos com pouca influência urbana como “Bom” ou “Muito bom” e os pontos urbanizados como “Regular” ou “Ruim”. Foram encontradas as espécies *Astyanax bimaculatus* (à montante do urbano e referencial) e *Poecilia reticulata* (área urbana e à jusante). Apenas em P2 não foram encontrados peixes, ponto urbano com menor valor de oxigênio obtido (<2%). A coloração em H.E. revelou histopatologias apenas nas brânquias de peixes presentes nos pontos urbanos e à jusante, com maior severidade na estação chuvosa. A IHQ mostrou maior expressão imuno-histoquímica de HSP70 em *P. reticulata*, presente nos pontos com maior influência urbana, com maior intensidade durante a época chuvosa. As análises branquiais demonstraram o estresse em que os peixes localizados na área urbana e à jusante se encontram, evidenciando o impacto negativo da urbanização sobre a ictiofauna local. Através de todas as análises realizadas é possível verificar a boa qualidade ambiental em que o Córrego da Palha se encontra antes de alcançar a área urbana de Diamantina e a baixa qualidade na região urbana. Apesar do

impacto negativo, os pontos mais à jusante da mancha urbana apresentaram incremento na qualidade ambiental, indicando uma leve recuperação de seu estado ambiental à medida em que o córrego se distancia da urbanização. Dessa forma, os resultados devem servir como subsídio para elaboração de políticas públicas junto aos gestores municipais para mitigar impactos e melhor conservação do córrego.

Palavras-chave: Bioindicadores. Rio urbano. Efluente urbano. Qualidade ambiental. Poluição urbana. Fauna aquática.

ABSTRACT

Urban growth in recent decades has reduced the environmental quality of urban rivers, negatively affecting local biodiversity. The main cause of this imbalance is the discharge of untreated domestic effluent. In Diamantina-MG, about 62% of households discharge sewage directly into the Straw Stream. The objective of this study was to evaluate the environmental integrity of the *Córrego da Palha*. Six sample points were collected along the stream and an additional sample point adopted as a reference in the *Córrego Formação*, a place with minimal anthropic influence. To characterize the environment the Protocol for Rapid Assessment of Habitat Diversity (PRAHD) was applied and physical-chemical parameters were measured. The presence of total and thermotolerant coliforms, in four sample points, was verified by the Most Probable Number technique. The community of benthic macroinvertebrates was surveyed and evaluated. Fishes were collected and their gills analyzed by Hematoxylin and Eosin (H.E.) and Immunohistochemistry (IHQ) techniques to verify the presence of histopathologies and HSP70 expression, respectively. While the PRAHD scores and dissolved oxygen were lower in urban sample points, the pH was higher, reflecting the surrounding urbanization. The samples upstream of the urban area had a low load of total and thermotolerant coliforms, differently from the urban samples and downstream that obtained maximum values. Macroinvertebrates showed low diversity in urban samples and downstream, with dominance of the Chironomidae family. The most sensitive taxons were found only in the distant sample points of urbanization. The spatial ordering indicated two community groups: one composed by the referential stretch and the upstream samples and the other by the samples with greater urban influence. The biotic indexes classified the sample points with less urban influence as "Good" or "Very Good" and the other samples as "Regular" or "Bad". The species *Astyanax bimaculatus* (upstream urban and referential samples) and *Poecilia reticulata* (urban and downstream samples) were found. Only in P2 (oxygen <2%) no fishes were found. The H.E. staining revealed histopathologies only in the gills of fishes present in urban and downstream sample points, with more severity

in the rainy season. IHQ showed high immunohistochemical expression of HSP70 in *P. reticulata* (sample points with greater urban influence) with greater intensity during the rainy season. The gill analyses demonstrated the stress in which fishes located in the urban and downstream areas are found, evidencing the negative impact of urbanization on the local fauna. Through all the analyses carried out it is possible to verify the good environmental quality in which the *Córrego da Palha* is located before reaching the urban area of Diamantina and the low quality in the urban area. Despite the negative impact, the sample points further downstream from the urban spot showed an increase in environmental quality, indicating a slight recovery of its environmental status as the stream distances itself from urbanization. In this way, the results should serve as a subsidy for the elaboration of public policies with municipal managers to mitigate impacts and better conservation of the stream.

Keywords: Bioindicators. Urban river. Urban effluent. Environmental quality. Aquatic fauna.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Precipitação média mensal entre os anos de 2010 e 2019 e ano de 2019 no município de Diamantina-MG.

Figura 2 - Localização dos sete pontos amostrais ao longo dos córregos da Palha e Formação, no município de Diamantina-MG.

Figura 3 - Escores e classificação do PARDH dos pontos amostrais ao longo dos córregos da Palha e Formação, Diamantina-MG, durante as estações chuvosa e seca de 2019.

Figura 4 - Poluição de efluentes domésticos ao longo do Córrego da Palha, Diamantina-MG.

Figura 5 - Pontos de coleta ao longo das áreas periurbana e urbana do Córrego da Palha, Diamantina-MG, durante as estações chuvosa e seca de 2019.

Figura 6 - Valores de média e desvio padrão das variáveis físicas e químicas de Temperatura, pH e OD dos pontos de coleta dos córregos da Palha e Formação, nos períodos de chuva e seca de 2019, pelo teste de Scott-Knott.

Figura 7 - Macroinvertebrados bentônicos mais representativos coletados nos córregos da Palha e Formação nas duas campanhas amostrais de 2019.

Figura 8 - Abundância relativa dos táxons mais representativos coletados no Córrego da Palha e Córrego Formação nas duas campanhas amostrais de 2019.

Figura 9 - Abundância de táxons (*shadeplot*) de macroinvertebrados ao longo das amostras coletadas nas estações chuvosa e seca de 2019, em área referencial, periurbana e urbana dos córregos da Palha e Formação.

Figura 10 - Ordenação NMDS da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em área urbana, periurbana e referência dos córregos da Palha e Formação.

Figura 11 - Peixes coletados no Córrego da Palha e Córrego Formação.

Figura 12 - Fotomicrografias de H.E. das brânquias de *Astyanax bimaculatus* coletados nos córregos da Palha e Formação, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019.

Figura 13 - Fotomicrografias de H.E. das brânquias de *Peocilia reticulata* coletados no Córrego da Palha, Diamantina-MG, e alterações histopatológicas presentes.

Figura 14 - Fotomicrografias de H.E. das brânquias de *Peocilia reticulata* coletados no Córrego da Palha, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019.

Figura 15 - Fotomicrografias de IHQ das brânquias de *Astyanax bimaculatus* coletados nos córregos da Palha e Formação, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019.

Figura 16 - Fotomicrografias de IHQ das brânquias de *Peocilia reticulata* coletados no Córrego da Palha, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos amostrais de coleta nos córregos da Palha e Formação e condições de zoneamento em que estão inseridos.

Tabela 2 - Índice de condição histopatológica de brânquias de peixes.

Tabela 3 - Número Mais Provável em 100ml de água de coliformes totais e termotolerantes nos pontos coletados ao longo do Córrego da Palha, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019.

Tabela 4 - Número de espécimes, abundância e riqueza dos táxons de macroinvertebrados bentônicos coletados no Córrego da Palha e Córrego Formação, nas estações chuvosa e seca de 2019.

Tabela 5 - Abundância total e relativa, riqueza e táxons exclusivos de macroinvertebrados coletados em diferentes condições dos córregos da Palha e Formação no ano de 2019.

Tabela 6 - Índices bióticos Biological Monitoring Working Party e Biological Monitoring Working Party/Average Score per Taxon e classificação de qualidade da água pelo índice BMWP/ASPT dos córregos da Palha e Formação.

Tabela 7 - Índice de condição histopatológico das brânquias de *Astyanax bimaculatus* e *Poecilia reticulata* coletados ao longo dos córregos da Palha e Formação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANOSIM	Análise de similaridade
ASPT	<i>Average Score Per Taxon</i>
BMWP	<i>Biological Monitoring Working Party</i>
CEUA	Conselho de Ética de Uso de Animais
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetra-hidrocarboneto
DCBIO	Departamento de Ciências Biológicas
EC	<i>Escherichia coli</i>
EPT	Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera
EUA	Estados Unidos da América
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
H.E.	Hematoxilina férrica e Eosina amarela
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 Quilodaltons
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEPHA	Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico
IHQ	Imuno-histoquímica
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
MG	Minas Gerais
NEA	Núcleo de Experimentação Animal
NMDS	Escalonamento dimensional não-métrico
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio dissolvido
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

LISTA DE SÍMBOLOS E GRANDEZAS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual que
≥	Maior ou igual que
®	Marca registrada
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
kDa	Quilodalton
Km	Quilômetro
m	Metro
M	Molar
mg/L	Miligrama por litro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número
°C	Graus Celsius
sp.	Espécie
x	Veze

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. OBJETIVO.....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Área de estudo.....	17
3.2. Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats	19
3.3. Parâmetros físico-químicos.....	19
3.4. Análises microbiológicas	20
3.5. Macroinvertebrados bentônicos	20
3.6. Peixes	21
3.6.1. Análises histopatológicas.....	22
3.6.2. Análise imuno-histoquímica	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats	24
4.2. Parâmetros físico-químicos.....	26
4.3. Análises microbiológicas	26
4.4. Macroinvertebrados bentônicos	27
4.5. Peixes	36
4.5.1. Análises histopatológicas.....	36
4.5.2. Análise imunohistoquímica.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
5.1. Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats	43
5.2. Parâmetros físico-químicos.....	44
5.3. Análises microbiológicas	46
5.4. Macroinvertebrados bentônicos	47
5.5. Peixes	50
5.5.1. Análises histopatológicas.....	52
5.5.2 Análise imuno-histoquímica	53
6. CONCLUSÃO	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9. ANEXOS.....	70

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos tempos, o crescimento urbano tem sido o principal elemento responsável pelo aumento da degradação dos recursos naturais (GOULART & CALLISTO, 2003). Devido à proximidade das povoações humanas, os rios urbanos estão entre os recursos que mais sofrem impactos oriundos da atividade humana (SANTOS, CORREIA & SANTOS, 2016). Alterações ambientais em rios urbanos compõem a denominada Síndrome de Corrente Urbana (FITZPATRICK, LONG & PIJANOWSKI, 2007), em que processos degradadores como a homogeneização do leito, eutrofização artificial e diminuição da diversidade de habitats, ameaçam a biodiversidade presente nesses ambientes (GOULART & CALLISTO, 2003). Para tanto, é essencial conhecer a extensão dos impactos causados pela urbanização na integridade ambiental dos rios urbanos para que se possam estabelecer políticas públicas afim de mitigar impactos (ZHOU, HU & YU, 2019).

De acordo com a Resolução n.º 001 do CONAMA (1986), pode se definir impacto ambiental como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do ambiente resultante de atividades humanas que afetem a biota, as condições estéticas e sanitárias do meio, a qualidade dos recursos ambientais e o bem-estar da população.

O esgoto doméstico é uma das principais fontes de poluentes que contribuem para o desequilíbrio de rios urbanos (BLUME *et al.*, 2010). A descarga desses efluentes afeta negativamente a qualidade da água dos rios, aumentando a quantidade de material orgânico e de bactérias de origem fecal (MALAGI *et al.*, 2020; RICHARDS *et al.*, 2016). Dados de 2017 da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) revelam que 12% da população brasileira ainda não tem acesso a serviços de esgotamento sanitário e apenas 49% possui residência com tratamento adequado.

De acordo com a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios de 2015, 84,7% da população brasileira vive em áreas urbanas (IBGE, 2016). Com o contínuo crescimento das cidades, há cada vez mais áreas urbanizadas no entorno de bacias. Bacia é a região em que a água proveniente de precipitação e de superfícies é drenada e conflui em um leito, como é o caso dos córregos, concentrando todos os processos presentes na área (PORTO & PORTO, 2008). Conhecer os impactos da urbanização nos corpos hídricos é fundamental para estabelecer práticas que visam o bom funcionamento dos rios e das cidades (MEYER, PAUL & TAULBEE, 2005). O monitoramento do estado ecológico de um corpo hídrico, isto é, avaliar

a condição de seus elementos biológicos, físicos e químicos em resposta a maior ou menor atividade humana, fornece informações que podem basear ações de caráter conservacionistas (LUZ & FERREIRA, 2011). Tais ações se fazem cada vez mais necessárias quando projeções de crescimento urbano indicam perdas elevadas da biota aquática (VAN METRE *et al.*, 2019).

Segundo a Política Nacional de Recursos Hídricos (Lei 9433/97), o bem estar humano e o equilíbrio ecológico não devem ser afetados pela deterioração da qualidade das águas. Desta forma, a legislação brasileira sustenta a utilização de bioindicadores de qualidade da água para avaliar o estado de conservação das comunidades biológicas (SILVEIRA, QUEIROZ & BOEIRA, 2004).

As bactérias do grupo coliformes, encontradas no solo e em ambiente aquático (HABERLAND *et al.*, 2012), apresentam anaerobiose facultativa além de fermentarem lactose (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Em áreas urbanas o lançamento de efluentes domésticos aumenta a carga populacional dessas bactérias, sendo a origem fecal associada (OLIVEIRA & CUNHA, 2014). Já as bactérias do grupo coliformes termotolerantes são indicadoras da presença de fezes de animais homeotérmicos (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Entéricas, fermentam lactose a 44,5°C, tendo como representante principal a espécie *Escherichia coli* (BRASIL, 2013). Nesse contexto, a avaliação da quantidade de coliformes termotolerantes em rios urbanos é um indicador importante para a promoção de políticas públicas que atendam às necessidades básicas da população, como saúde e saneamento (SOUZA *et al.*, 2017).

Estudos envolvendo a utilização de macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade de ecossistemas hídricos continentais vêm sendo realizados no Brasil nos últimos anos (NICACIO & JUEN, 2015; BRANDIMARTE & MELO, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; SOUZA, MUNIZ & JUNIOR, 2018; MENEZES, OLIVEIRA & SALLA, 2019). No estado de Minas Gerais, Santos, Correia & Santos (2016) avaliaram o impacto que o município de Uberaba exercia sobre o Rio Uberaba. Estes autores utilizaram dez métricas para avaliar a estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos e encontraram nos trechos à montante da cidade um ecossistema preservado enquanto no trecho à jusante havia grande impacto ambiental, com elevado grau de alteração. Na bacia do Rio Jequitinhonha, situada na porção Norte/Nordeste do estado de Minas Gerais, há poucos estudos avaliando impactos antropogênicos e de urbanização sobre os macroinvertebrados bentônicos. No município de Diamantina, localizado na porção mineira da Serra do Espinhaço, Bispo,

Lourenço & Garraffoni (2015) avaliaram o impacto do turismo local sobre a comunidade bentônica de um córrego. Eles observaram que a atividade turística afeta a diversidade e abundância dos bentos, com diminuição significativa desses índices após dias de maior movimentação de turistas nos locais estudados.

A utilização de peixes como bioindicadores da qualidade ecológica têm se mostrado eficiente, refletindo diversos distúrbios ambientais (FREITAS & SOUZA, 2009). No nível de comunidade, a degradação da vegetação ripária de riachos ocorrente nos processos de urbanização diminui consideravelmente a diversidade de peixes (CASATTI *et al.*, 2012). A contaminação aquática pode causar alterações morfofisiológicas em peixes, o que tem promovido diversos estudos envolvendo esse grupo de animais (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Dentre os órgãos estudados, as brânquias são uma importante ferramenta na investigação da poluição ambiental devido sua sensibilidade e potencial degeneração tecidual pelos poluentes (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; CAMARGO & MARTINEZ, 2007). Ambientes poluídos podem gerar estresse em células branquiais, ocasionando desde superexpressão de determinadas proteínas até lesão e morte celular (SALES *et al.*, 2017). Avaliando a expressão do Fator de crescimento endotelial vascular em brânquias de peixes do Córrego da Palha, em Diamantina-MG, Viana (2018) observou que a expressão encontrada se relacionava com os baixos valores de oxigênio dissolvido na água do rio urbano. A investigação de outros biomarcadores moleculares, como a proteína HSP70, tem se mostrado eficiente em estudos de distúrbios ambientais causados por inúmeras substâncias (MOREIRA-DE-SOUSA, DE SOUZA & FONTANETTI, 2018).

As proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) são chaperonas que desempenham papel importante nos processos de dobramento de proteínas recém-sintetizadas e redobramento de proteínas mal dobradas e agregadas (KAMPINGA & CRAIG, 2010; HARTL, BRACHER, & HAYER-HARTL, 2011; MAYER & GIERASCH, 2019). A HSP70 interage dentro e fora das células com diversas outras proteínas que modulam ações fundamentais para a homeostase celular (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ & VALPUESTA, 2018). Presentes nas células em condições homeostáticas, as HSPs são superexpressas na ocorrência de estresses celulares como calor ou estresse oxidativo (AKERFELT, MORIMOTO & SISTONEN, 2010). Poluentes oriundos de efluentes domésticos também podem desencadear produção massiva de HSP70 em tecidos de animais aquáticos. Aumento nos níveis de HSP70 em brânquias de mexilhões foram registrados após exposição à cafeína, que possui ação neuroativa e é um contaminante

comumente encontrado nos sistemas aquáticos urbanos (DEL REY, GRANER, & BUCKLEY, 2011). Em peixes, fatores como choque térmico, exposição a metais pesados, pesticidas e infecção microbiana podem aumentar a produção de HSPs nos tecidos como resposta ao estresse (IWAMA *et al.*, 2004). A HSP70 induz resposta imune em tecidos de peixes, incluindo brânquias, aumentando a tolerância ambiental dos peixes (CHEN *et al.*, 2014). No Brasil, Macêdo *et al.* (2020) investigaram os efeitos do rompimento de uma barragem de rejeitos de mineração avaliando brânquias e fígado de uma espécie de *Astyanax*. Realizado no município de Mariana-MG, o estudo supracitado revelou maior expressão de HSP70 nas brânquias quanto mais próximo da área do rompimento, onde há maior concentração de metais pesados. Em estudo conduzido em Diamantina-MG, Pereira (2018) avaliou a influência do aquecimento térmico na expressão de HSP70 em brânquias de *Astyanax brevirostris*, concluindo que a expressão da proteína aumentava com o acréscimo de temperatura.

Nas últimas décadas o município de Diamantina, estado de Minas Gerais, vem sofrendo um crescimento desordenado de moradias, resultando na ocupação marginal do Córrego da Palha. Conseqüentemente, há também o aumento de descarga de esgoto sanitário doméstico no leito fluvial (ARAÚJO *et al.*, 2016). De acordo com o IBGE (2020), o município apresenta 76,5% de domicílios com esgotamento sanitário adequado, isto é, rede geral de esgoto ou fossa séptica. Na área urbana, 61,65% dos domicílios possuem rede sanitária de esgoto que despejam de forma direta e sem tratamento seus dejetos no Córrego da Palha (GARRAFFONI & PEREIRA, 2012).

Nesse sentido, se faz necessário conhecer o impacto da urbanização de Diamantina nas características ambientais e biota presentes no Córrego da Palha, e sua variação ao longo do gradiente de urbanização existente entre sua nascente e posterior à área urbana.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar a integridade ambiental do Córrego da Palha/Diamantina-MG.

2.2. Objetivos específicos

- i) Caracterizar ambientalmente o Córrego da Palha;
- ii) Quantificar bactérias dos grupos coliformes totais e termotolerantes na água do Córrego da Palha;
- iii) Avaliar o impacto da urbanização na estrutura das comunidades de macroinvertebrados bentônicos ao longo do curso do Córrego da Palha;
- iv) Analisar a morfofisiologia e imuno-histoquímica das brânquias de peixes, relacionando-as com a qualidade da água no Córrego da Palha.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado no Córrego da Palha, em Diamantina-MG, em duas campanhas amostrais: estação chuvosa (fevereiro de 2019) e estação seca (setembro de 2019). As estações foram definidas de acordo com os dados de precipitação mensal média da última década, registrada pelo Instituto Nacional de Meteorologia (Figura 1). Seguindo a classificação de Köppen-Geiger, o clima do Município é mesotérmico do tipo Cwb, temperado úmido, com inverno frio e seco e verão quente e úmido (Alvares *et al.*, 2013).

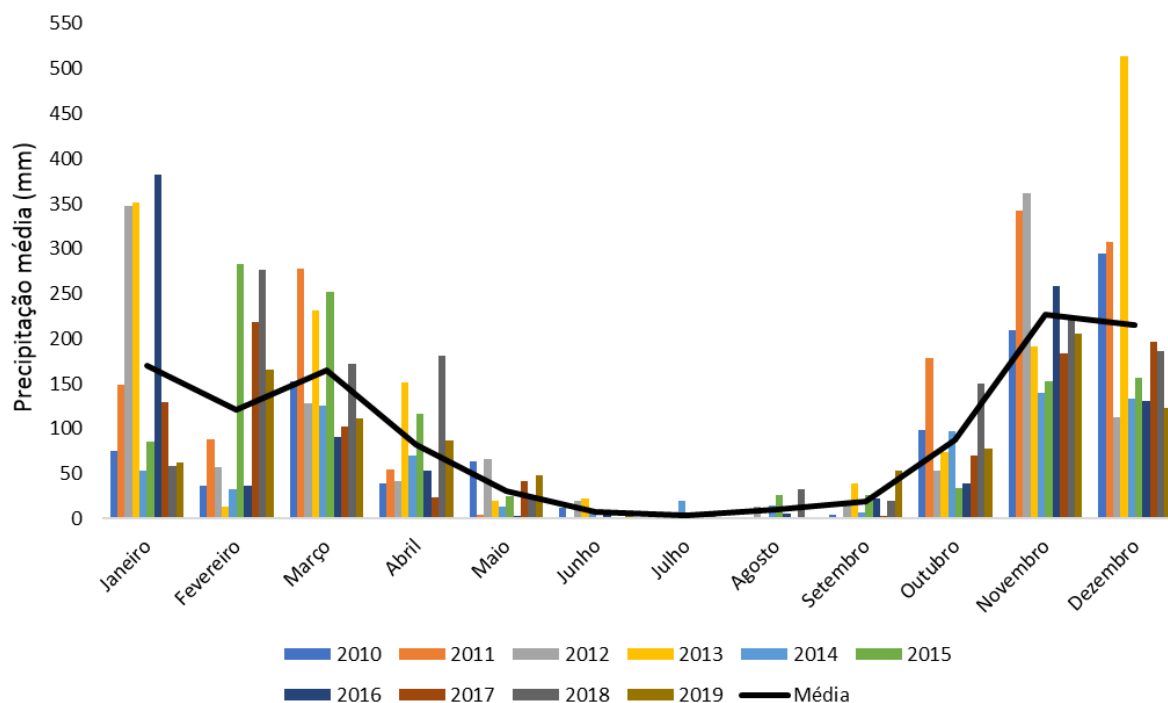


Figura 1. Precipitação média mensal (mm) entre os anos de 2010 e 2019 e ano de 2019 no município de Diamantina-MG, de acordo com dados pluviométricos registrados pelo INMET.

Diamantina é um município situado na mesorregião do Vale do Jequitinhonha, Nordeste do estado de Minas Gerais (NASCIMENTO, 2009). Inserido no bioma Cerrado, sua população estimada no ano de 2020 é de cerca de 48.000 habitantes (IBGE, 2020). Ocupa uma área de 3892Km² e está a aproximadamente 1100 metros de altitude ao nível do mar (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Dentre seus principais cursos fluviais está o Córrego da Palha, também denominado como Rio Grande ou Córrego Quatro Vinténs. Com extensão total de 10,9Km, é um rio urbano

de baixa ordem que integra a Bacia Hidrográfica do Rio Jequitinhonha. Sua nascente se localiza na Serra dos Cristais, área do complexo rochoso Cordilheira do Espinhaço, tombada como bem natural e patrimônio cultural urbano no ano de 2010 pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais (IEPHA/MG, 2014). Após percorrer vários bairros de Diamantina o Córrego da Palha deságua no Ribeirão do Inferno, afluente do Rio Jequitinhonha.

Foram amostrados seis pontos ao longo do Córrego da Palha: P1, à montante do perímetro urbano, P2, P3 e P4 no perímetro urbano, e, P5 e P6 à jusante do perímetro urbano (Figura 2). Foi avaliado um ponto com o entorno não antropizado no Córrego Formação (P7), o assumindo como parâmetro ecológico para fins de comparação. Os sete pontos amostrais selecionados possuem distância mínima de 1000m entre si, garantindo a independência das amostras.

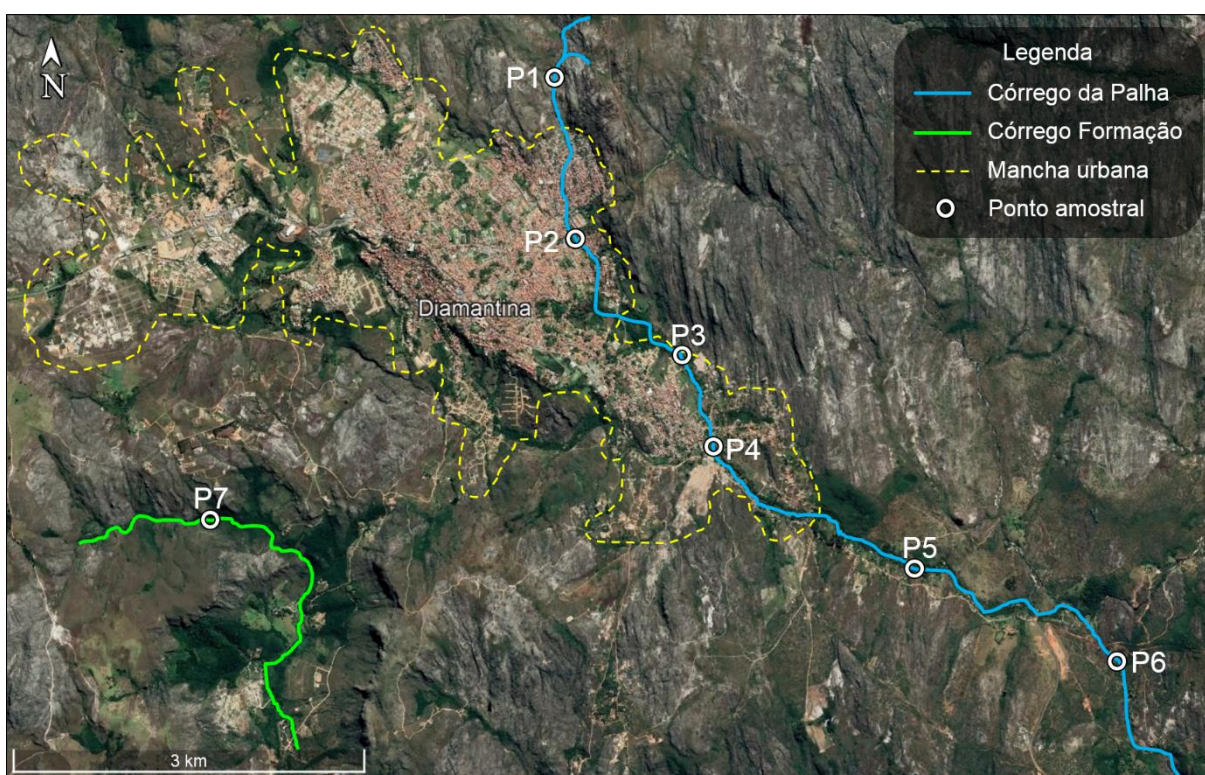


Figura 2. Localização dos sete pontos amostrais ao longo dos córregos da Palha e Formação, no município de Diamantina-MG.

De acordo com França & Bergamaschi (2011), consideramos como região urbana toda área ocupada por vias e edificações contínuas e como região periurbana, a área rural localizada no entorno da faixa urbana. Desse modo, os pontos P1, P5 e P6 se encaixam como área periurbana, P2, P3 e P4 como área urbana, e, P7 como ambiente natural (Tabela 1).

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos amostrais de coleta nos córregos da Palha e Formação e condição de zoneamento em que estão inseridos.

Ponto amostral	Coordenadas geográficas		Condição de zoneamento
	Longitude (Sul)	Latitude (Oeste)	
P1	18°13'39.80"	43°35'41.89"	Periurbana
P2	18°14'36.07"	43°35'30.78"	Urbana
P3	18°15'6.93"	43°35'2.93"	Urbana
P4	18°15'29.85"	43°34'55.46"	Urbana
P5	18°16'2.31"	43°33'46.84"	Periurbana
P6	18°16'34.75"	43°32'56.65"	Periurbana
P7	18°15'50.40"	43°37'17.90"	Ambiente Natural

3.2. Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats

Em cada ponto de coleta foi aplicado o Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats (PARDH) (Anexo A), adaptado por Callisto *et al.* (2002) para os ecossistemas lóticos do estado de Minas Gerais. O protocolo possui 22 parâmetros para a caracterização visual das condições da água, leito, vegetação nos cursos d'água e entorno. De acordo com as características encontradas em cada sítio avaliado, obtém-se um valor de escore que varia entre 0 e 100 pontos, classificando o local como ambiente impactado (≤ 40 pontos), alterado (entre 41 e 60 pontos) ou natural (≥ 61 pontos).

3.3. Parâmetros Físico-Químicos

Em cada ponto de coleta foram registrados, *in situ* e em triplicata, parâmetros físico-químicos da água de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH e Oxigênio Dissolvido (mg/l), através de medidor multiparâmetro (Hanna® HI 9828). Para a comparação das variáveis físico-químicas entre pontos e estações, os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), adotando nível de significância de menor/igual a 0,05. Os parâmetros físicos foram adotados como variáveis repostas e os pontos amostrais e estações chuvosa e seca como variáveis fixas. Com os resultados aplicamos o teste de Scott-Knott para saber o tamanho da diferença entre os dados dos pontos amostrais, utilizando a função *sk* do pacote *Scottknott* (JELIHOVSCHI, FARIA & ALLAMAN, 2014). Todas as análises foram feitas utilizando o ambiente R (R CORE TEAM, 2018).

3.4. Análises Microbiológicas

Amostras de água foram coletadas em 4 pontos ao longo do Córrego da Palha: P1, P2, P4 e P6 (Figura 2) para a realização de análise microbiológica, de acordo com o recomendado pela Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2013). Acondicionadas em frascos de vidro estéreis com volume total de 250ml, as amostras devidamente identificadas e mantidas sob refrigeração foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Farmácia/UFVJM. Foi realizado teste presuntivo de coliformes totais, através da técnica do número mais provável (NMP), para verificar a presença de bactérias produtoras de gás do grupo coliformes. Com o auxílio de pipetas esterilizadas, as amostras de água foram inoculadas em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos. Para cada ponto amostral foram preparadas 3 diluições (1:1; 1:10; 1:100) em cinco subamostras: cinco tubos de ensaio contendo 10 ml de água amostrada e 10 ml de caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST), cinco tubos contendo 1 ml de água amostrada e 9 ml de caldo LST, e, cinco tubos contendo 0,1 ml de diluições do material amostrado e 9,9 ml de caldo LST. Após a inoculação os tubos foram incubados em estufa a 35°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) durante 48 horas. As amostras cujo tubo de Durhan havia a presença de gás em seu interior foram consideradas positivas para o teste presuntivo. As amostras positivas seguiram para a verificação de coliformes termotolerantes, sendo transferidas com auxílio de palitos de madeira esterilizados para tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos e 10 ml de meio de cultura EC. Permaneceram imersas em banho maria a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. As amostras em que houve formação de gás em seu interior foram consideradas positivas, sendo o resultado calculado de acordo a tabela de Número Mais Provável (NMP) (Anexo B). O NMP é determinado pelo número de tubos positivos que apresentaram as amostras das diluições 1:1; 1:10 e 1:100 nos testes de coliformes totais e termotolerantes.

3.5. Macroinvertebrados Bentônicos

Para a avaliação da comunidade dos macroinvertebrados bentônicos, em cada ponto de coleta o material de fundo foi amostrado utilizando amostrador do tipo Surber de malha de 250 μm e área amostral de 900 cm^2 , de acordo com Silveira *et al* (2004). Em cada ponto foram coletadas quatro subamostras, com distância mínima de 3m entre si, em substrato rochoso com correnteza, predominantemente nu e ocasionalmente com presença de musgos, folhas, areia e/ou biofilme.

O material coletado foi acondicionado em frascos plásticos devidamente identificados, fixados em paraformaldeído 5% (SILVEIRA *et al.*, 2004) e transportados até o laboratório de Ecofisiologia Animal/DCBio no Campus JK da UFVJM. As amostras foram lavadas em água corrente com peneira de malha de 250 μm , sendo os espécimes biológicos triados e identificados até o nível taxonômico de Família ou o menor possível. Foi utilizado literatura como suporte para a identificação taxonômica (FROEHLICH, 2007; MUGNAI, NESSIMIAN & BAPTISTA, 2010) e microscópio estereoscópio para a observação das estruturas. Uma vez identificados, os espécimes foram preservados em álcool etílico 80%.

Para avaliar a estrutura das comunidades de macroinvertebrados bentônicos foram utilizadas as métricas de abundância (total e relativa), riqueza (s) e gráfico de sombreamento (*shadeplot*) da abundância transformada por ‘*dispersion weighting*’ e raiz quadrada.

Para testar a diferença entre as condições referência, periurbano e urbano das amostras foi utilizada a análise de similaridade (ANOSIM), baseada na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis, com matriz de dados previamente transformada por raiz quadrada, utilizando o ambiente R (R CORE TEAM, 2018) pela função anosim do pacote *vegan*. Os padrões espaciais na estrutura da comunidade foram representados pela análise de ordenação de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), utilizando a função metaNMDS do pacote *vegan*.

Foi aplicado o índice Biological Monitoring Working Party (BMWP), adaptado do BMWP Minas proposto por Junqueira *et al.* (2018), e incluso os escores para os táxons Nematoda e Collembola de acordo com Camelo (2013) (Anexo C). O índice pontua táxons de acordo com sua sensibilidade (alta pontuação) ou tolerância (baixa pontuação) à poluição e gera um escore de acordo com a presença desses táxons em cada ponto de coleta. Com o resultado do BMWP foi calculado o índice Biological Monitoring Working Party/Average Score per Taxon (BMWP/ASPT) Minas, de acordo com Junqueira *et al.* (2018). Esse índice classifica a qualidade da água dos pontos de coleta a partir da riqueza taxonômica de macroinvertebrados encontradas, dividindo o escore obtido pelo BMWP pelo número de táxons presentes.

3.6. Peixes

Foram capturados seis peixes em cada ponto amostral utilizando rede de arrasto com dimensões de um metro e meio de altura por três metros de largura e malha de 5x15 mm. A captura ocorreu em áreas com presença de cardume, onde há maior concentração e abundância

de peixes, otimizando a coleta. Os animais foram eutanasiados nos locais de amostragem através de secção cortical, seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA (Portaria nº 596 de 25 de junho de 2013). O estudo foi realizado com aprovação prévia do parecer número 030/2017 pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA)-UFVJM (Anexo F) e registro SISBIO 26291-2.

Amostras de brânquias foram dissecadas e fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas e transferidas para solução tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 onde permaneceram até o momento de parafinização. Nesse processo, os tecidos sofreram desidratação através de imersão em álcool etílico 50% pernoite e por uma série de banhos em álcool etílico (60%,70%, 80%, 90%, 100% I e 100% II, respectivamente) pelo período de uma hora em cada concentração. Logo após passaram pelo processo de diafanização, tornando o tecido translúcido, através de duas imersões em composto xilol durante uma hora cada. Em seguida foi realizada a inclusão, em que os tecidos foram fixados em parafina histológica. Inicialmente imersos em parafina em uma estufa a 60°C pernoite, foram realocados em nova parafina pelo período de uma hora, sendo confeccionados blocos de 2x3 cm contendo o tecido em estudo. Em um micrótomo (ERM 3100) foram feitos cortes de secções de 5µm e depositados em lâminas de vidro para microscopia.

3.6.1. Análises histopatológicas

Para a visualização de alterações histopatológicas das brânquias através da microscopia de luz, foram realizadas colorações de Hematoxilina férrica e Eosina amarela (H.E.) (Anexo D). Com essa técnica foi possível contrastar as estruturas teciduais e diferenciar o citoplasma do núcleo, permitindo a caracterização e identificação morfológica dos tipos celulares. O mínimo de 3 espécimes de cada ponto amostral foi utilizado na realização da técnica. Foram feitas fotomicrografias em microscópio óptico (modelo Labomed LX400p) em aumentos de 400x e 1000x para a visualização das estruturas teciduais.

As alterações histopatológicas visualizadas pela técnica de H.E. foram listadas, sendo calculado o índice de condição histopatológico (Tabela 2). Adaptado de Antunes *et al.* (2017), o índice avalia o grau de severidade das lesões branquiais. Cada tipo de lesão observada recebe um valor entre 1 e 3, atribuído pelo impacto causado nas funções branquiais e sobrevivência do peixe. Quanto mais severa a lesão, maior o valor. Os valores das lesões encontradas em cada local são então somados, gerando uma pontuação total. Quanto maior a pontuação maior o impacto histopatológico sofrido pelas brânquias.

Tabela 2. Índice de condição histopatológica de brânquias de peixes. Adaptado de Antunes *et al.* (2017).

Alteração Histopatológica	Congestão vascular	Fusão parcial dos filamentos	Proliferação do epitélio filamentososo	Aneurisma	Fusão total dos filamentos
Escore	1	2	2	3	3

3.6.2. Análise imuno-histoquímica

Foi realizada a imuno-histoquímica (IHQ) das brânquias para identificar a presença tecidual da proteína HSP70 pela reação com anticorpo específico (Anexo E). Utilizamos o anticorpo HSP70 monoclonal (*mice* BRM-22 Sigma, EUA) diluído em solução PBS (Tampão fosfato-salino) na proporção de 1:1000. Cada lâmina de vidro foi preenchida com três cortes teciduais. Em dois cortes foram aplicados 50µl de anticorpo e em um 50µl de solução PBS, sendo esse utilizado como controle negativo da reação. Nos três cortes foram aplicados o cromógeno DAB (tetra-hidrocarboneto 3,5-diamino-benzidina). Durante a técnica o anticorpo presente no tecido reage com o DAB, produzindo coloração em tonalidade marrom-amarelada. Quanto maior a coloração tecidual, maior a expressão imuno-histoquímica da proteína HSP70. Foi utilizado Hematoxilina férrica como contra-coloração do cromógeno.

Após a realização da técnica de IHQ as lâminas foram montadas com cobertura de resina Permout® e lamínulas de vidro para a proteção dos fragmentos teciduais. Depois da secagem em temperatura ambiente por 72 horas foram feitas fotomicrografias em microscópio óptico (modelo Labomed LX400p) em aumento de 1000x para a visualização da expressão imuno-histoquímica nos tecidos.

4. RESULTADOS

4.1. Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats

O Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitat indicou os maiores escores no ponto amostral de referência (P7) e próximo a cabeceira do Córrego da Palha (P1), nos dois períodos pluviométricos amostrados (Figura 3). Com pontuações próximas ao máximo, esses pontos foram classificados pelo PARDH como ambientes naturais. Os pontos urbanos P2, P3 e P4 obtiveram escores maiores no período chuvoso (ambientes alterados) que no período seco (ambientes impactados), enquanto P5 e P6 apresentaram pouca variação entre estação chuvosa e seca, ambos classificados como ambientes alterados.

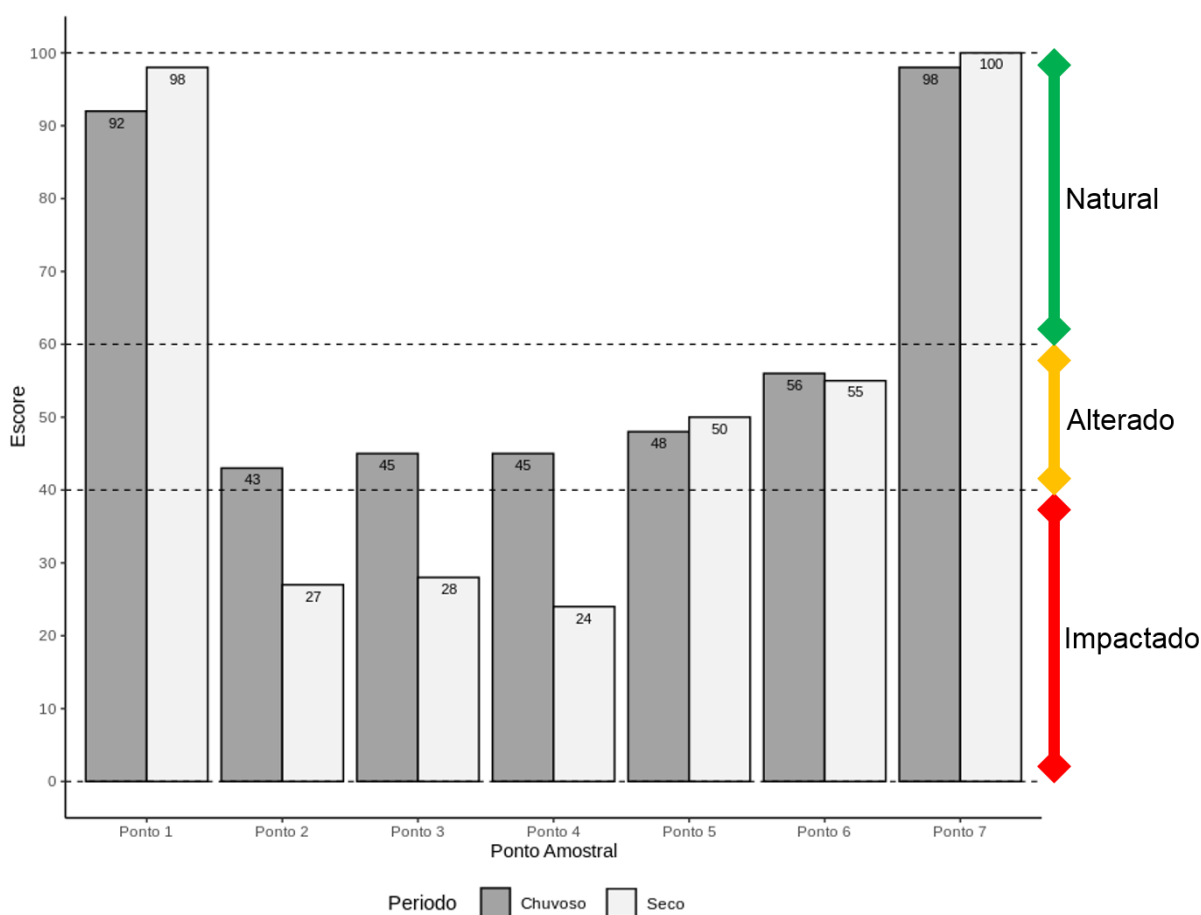


Figura 3. Escores e classificação do Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitat dos pontos amostrais ao longo dos córregos da Palha e Formação, Diamantina-MG, durante as estações chuvosa (fevereiro) e seca (setembro) de 2019.

Enquanto os pontos periurbanos apresentaram pouca variação entre os escores das duas campanhas amostrais, os pontos urbanos apresentaram diferença acentuada entre as pontuações obtidas. Parâmetros como a presença de água fortemente turva, espuma e odor fétido,

relacionados ao lançamento de efluentes nos pontos urbanos (Figura 4), geraram menores pontuações durante o período seco. Enquanto P1 e P7 não apresentaram variações visuais aparentes, os demais pontos variaram entre os dois períodos amostrados (Figura 5).



Figura 4. Poluição de efluentes domésticos ao longo do Córrego da Palha, Diamantina-MG. (A) Despejo direto de esgoto doméstico no Córrego da Palha. (B) Contaminação de efluentes domésticos no Córrego da Palha. (C) Espuma superficial no Córrego da Palha.



Figura 5. Pontos de coleta ao longo das áreas periurbana e urbana dos córregos da Palha e Formação em Diamantina-MG, durante as estações chuvosa e seca de 2019.

4.2. Parâmetros Físico-Químicos

As análises físico-químicas de temperatura, pH e oxigênio dissolvido apresentaram variações significativas entre as médias das duas estações analisadas (Figura 6). Com exceção de P5, as temperaturas de todos os pontos variaram significativamente entre os períodos seco e chuvoso, sendo no total maior na época de chuva (24,03°C). O pH foi maior nos pontos urbanizados do córrego e durante o período de chuva (6,85). Já OD apresentou valores bem inferiores nos pontos urbanizados que nos pontos não urbanizados. Enquanto nos pontos urbanos o OD foi maior durante o período chuvoso, os outros obtiveram maior quantidade de oxigênio dissolvido no período seco.

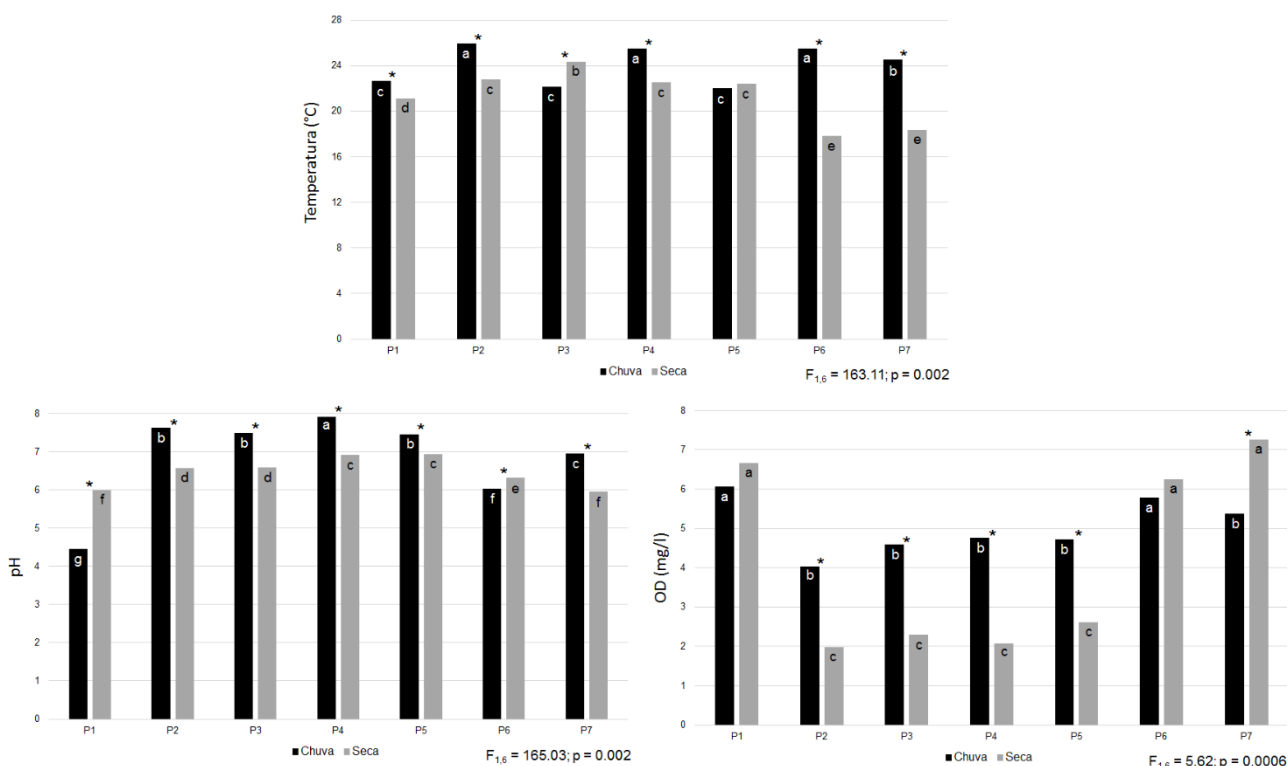


Figura 6. Valores de média e desvio padrão (n=3) das variáveis físicas e químicas de Temperatura, pH e OD dos pontos de coleta dos córregos da Palha e Formação, nos períodos de chuva e seca de 2019, pelo teste de Scott-Knott, $P \leq 0.05$. Pontos com letras diferentes nas colunas e asterisco entre os períodos diferem entre si pelo teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

4.3. Análises Microbiológicas

Os testes bacteriológicos indicaram valores baixos de NMP/100ml próximo à nascente do córrego e valores altos de NMP no restante de seu curso (Tabela 3). No primeiro ponto amostral o valor de NMP para coliformes totais foi baixo (130) durante o período chuvoso e máximo (1600) no período seco. O teste de coliformes termotolerantes neste ponto apresentou

valor muito baixo (50) no período chuvoso enquanto na estação seca o valor de NMP foi o mínimo possível (<2). Os outros três pontos amostrais ao longo do Córrego da Palha apresentaram valores máximos de NMP (1600) nos testes de coliformes totais e termotolerantes tanto na estação chuvosa como na seca.

Tabela 3. Número Mais Provável (NMP) em 100ml de água de coliformes totais e termotolerantes nos pontos coletados ao longo do Córrego da Palha, Diamantina-MG, nas estações chuvosa (fevereiro) e seca (setembro) de 2019. Valores de NMP retirados do manual prático de análise de água da Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2013). Valor mínimo < 2 e máximo 1600.

Ponto Amostrai	Coliformes Totais (NMP/100ml)		Coliformes Termotolerantes (NMP/100ml)	
	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca
P1	130	1600	50	< 2
P2	1600	1600	1600	1600
P4	1600	1600	1600	1600
P6	1600	1600	1600	1600

4.4. Macroinvertebrados Bentônicos

Um total de 6.019 espécimes foi registrado, distribuídos em 38 táxons (Tabela 4). Na estação chuvosa a abundância total foi de 2.344 macroinvertebrados e riqueza de 29 táxons, enquanto na seca, foram identificados 3.675 indivíduos, em 38 táxons. A família Chironomidae foi a mais abundante em todos os pontos e estações, com exceção de P2 durante a seca em que Psychodidae foi mais numerosa (Tabela 4; Figura 9).

Tabela 4. Número de espécimes, abundância e riqueza dos táxons de macroinvertebrados bentônicos coletados no Córrego da Palha e Córrego Formação, nas estações chuvosa (Ch) e seca (Se) de 2019.

Grupo taxonômico	Família	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		Total
		Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se			
Nematoda						1		1				46		2		50
Oligochaeta			1		1	3	1	2	2	12	4	1	203	7	2	239
Mollusca	Physidae							1				1				2
	Planorbidae												7			7
Arachnida	Hydracarina	7	2	5	14	4	3	1	6	3	1	2	2	24	20	94
Collembola			1	9	9	21	8	5	5	4	6		25			93
Ephemeroptera	Baetidae	4	15											169	87	275
	Leptophlebiidae		1											7	13	21
Plecoptera	Gripopterygidae													7	10	17
	Perlidae													2	2	4
Trichoptera	Calamoceratidae														4	4
	Helicopsychidae														7	7
	Hydrobiosidae		2											3	7	12

Grupo taxonômico	Família	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		Total
		Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	
	Hydropsychidae	1												7	19	27
	Hydroptilidae	6	18									1		103	100	228
Diptera	Blephariceridae		1													1
	Ceratopogonidae		6		2	2	1	1							23	35
	Chironomidae	64	38	350	41	152	87	79	146	593	291	45	712	422	1189	4209
	Culicidae				28		10		6					1		45
	Empididae				1				1	1				3	4	10
	Psychodidae			24	79	11	82	11	104	5	4	3		2		325
	Simuliidae	2	7	2							13			60	83	167
	Stratiomyidae				1											1
Coleoptera	Elmidae	2	1					4		1				44	56	108
	Haliplidae													1		1
	Hydrophilidae											4	1			5
	Psephenidae													4	3	7

Grupo taxonômico	Família	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		Total
		Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	
	Staphilinidae								3			1				4
	Torridincolidae		2												1	3
Odonata	Calopterygidae	1														1
	Coenagrionidae	1														1
	Libellulidae	1													2	3
	Protoneuridae	1														1
Lepidoptera	Pyralidae						1								6	7
Hemiptera	Gerridae														1	1
	Hebridae			1			1									2
	Mesoveliidae												1			1
	Veliidae														1	1
Abundância (n)		90	95	391	176	193	195	104	274	632	306	58	997	876	1632	6019
Riqueza (s)		11	13	6	9	6	10	8	9	8	5	8	8	20	20	38

Apenas nove táxons apresentaram abundância acima de 1% (Figuras 7 e 8), constituindo 95,33% da abundância total. A família Chironomidae foi a mais abundante com 69,9% seguido de Psychodidae 5,3%, Baetidae 4,5%, Oligochaeta 3,9%, Hydroptilidae 3,7%, Simuliidae 2,7%, Elmidae 1,7%, e Hydracarina e Collembola com 1,5% cada (Figura 8).

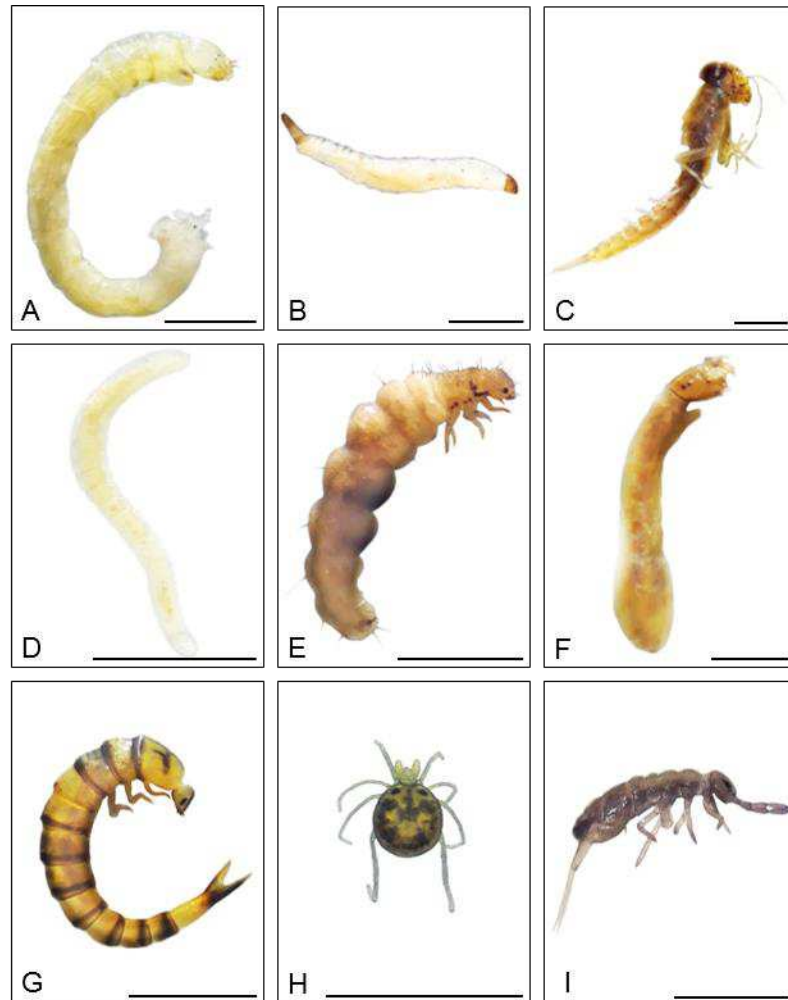


Figura 7. Macroinvertebrados bentônicos mais representativos (>1%) coletados nos córregos da Palha e Formação nas duas campanhas amostrais de 2019. (A) Chironomidae; (B) Psychodidae; (C) Baetidae; (D) Oligochaeta; (E) Hydroptilidae; (F) Simulidae; (G) Elmidae; (H) Hydracarina; (I) Collembola. Barra: 1mm.

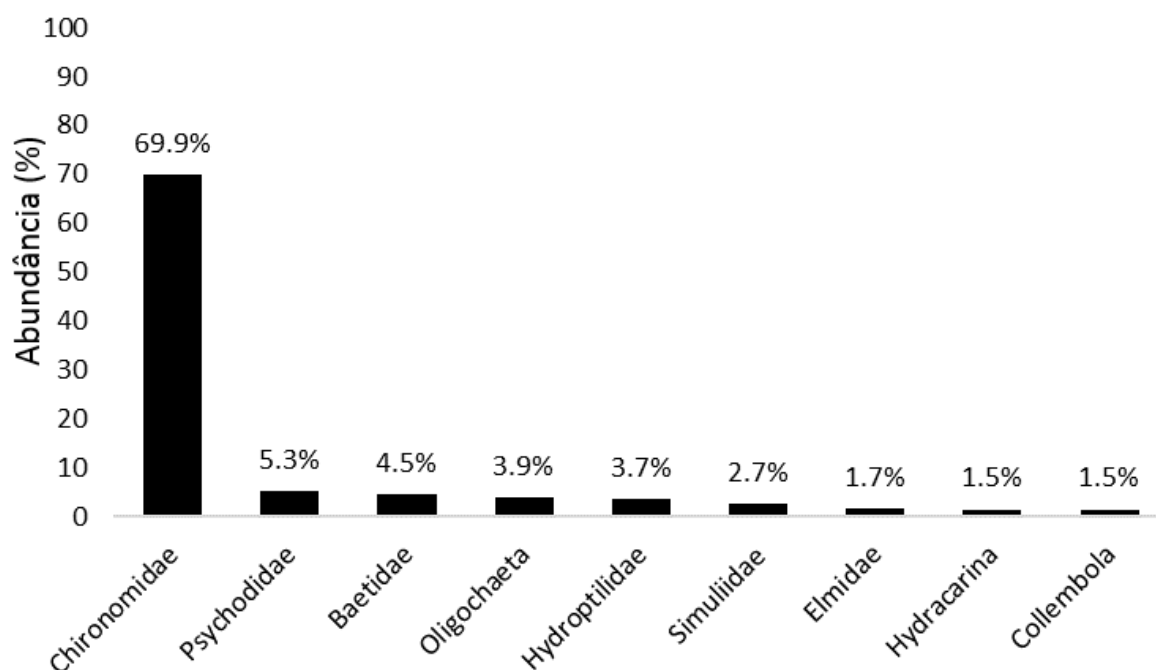


Figura 8. Abundância relativa dos táxons mais representativos (>1%) coletados no Córrego da Palha e Córrego Formação nas duas campanhas amostrais de 2019.

A riqueza total nas condições referência e periurbano foi de 26 táxons em cada condição, enquanto que na condição urbano foram registrados 16 táxons, com variação na abundância entre as três condições (Tabela 5). O ponto de referência (P7) apresentou oito táxons exclusivos e concentrou a maior parte da abundância total (41,7%), especialmente dos táxons mais sensíveis (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Elmidae e Psephenidae) (Tabela 5, Figura 9). Os pontos na condição urbano apresentaram menor abundância total (22,1%) e alta dominância de poucos táxons (Chironomidae, Psychodidae, Collembola e Hydracarina - que representaram 95% da abundância total nesta condição) (Tabela 5, Figura 9). Os pontos nas condições periurbano e urbano apresentaram diminuição gradual da abundância de táxons mais sensíveis, até o desaparecimento, e abundância crescente de táxons tolerantes como Psychodidae, Collembola e Culicidae (Figura 9).

Tabela 5. Abundância total e relativa, riqueza e táxons exclusivos de macroinvertebrados coletados em diferentes condições dos córregos da Palha e Formação no ano de 2019.

	Referência	Periurbano	Urbano
Abundância total	2.508	2.178	1.333
Abundância relativa	41,7%	36,2%	22,1%
Riqueza	26	26	16
Táxons exclusivos	8	7	2

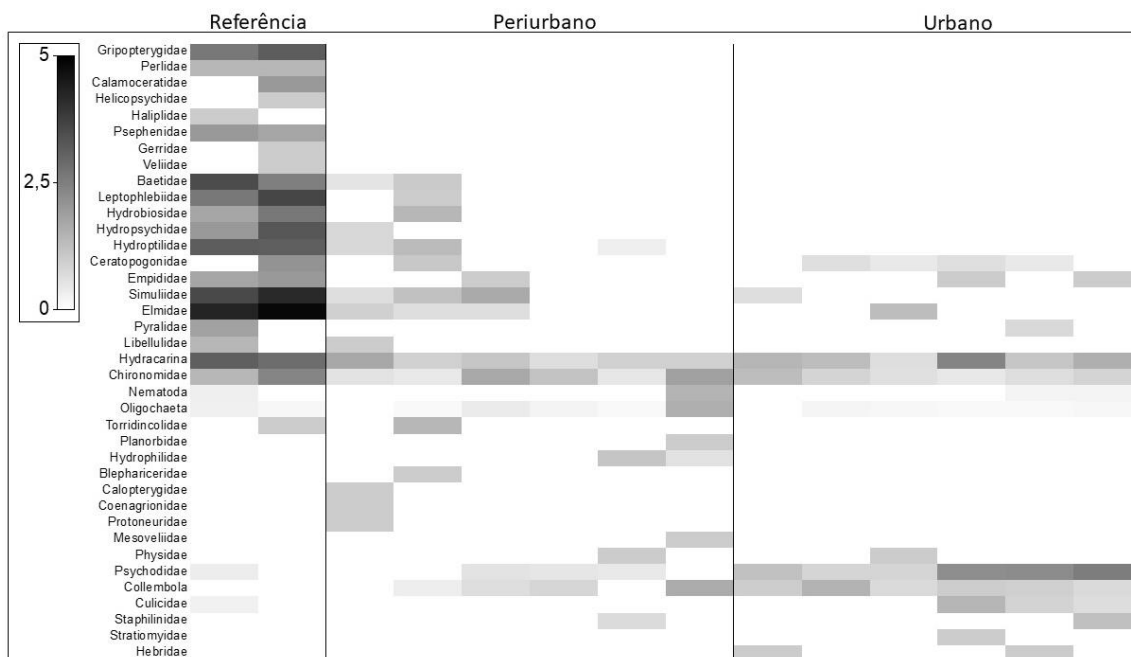


Figura 9. Abundância de táxons (*shadeplot*) de macroinvertebrados ao longo das amostras coletadas nas estações chuvosa e seca de 2019, nas condições referência, periurbano e urbano dos córregos da Palha e Formação. O gradiente de intensidade de cinza representa a abundância transformada (*'dispersion weighting'* e raiz quadrada), conforme a legenda.

A ANOSIM evidenciou a diferença na estrutura das comunidades de macroinvertebrados aquáticos entre as três condições avaliadas ($R=0,344$ e $p=0,011$). A ordenação por NMDS permite visualizar segregação espacial entre as amostras das três condições avaliadas, com agrupamento dos pontos urbanos e dispersão dos periurbanos (Figura 10). A formação de dois grandes conjuntos foi observada, sendo um composto pelo ponto de referência e à montante da área urbana (P1C e P1S) e outro de pontos urbanos e à jusante (P5C, P5S, P6C e P6S) (Figura 10).

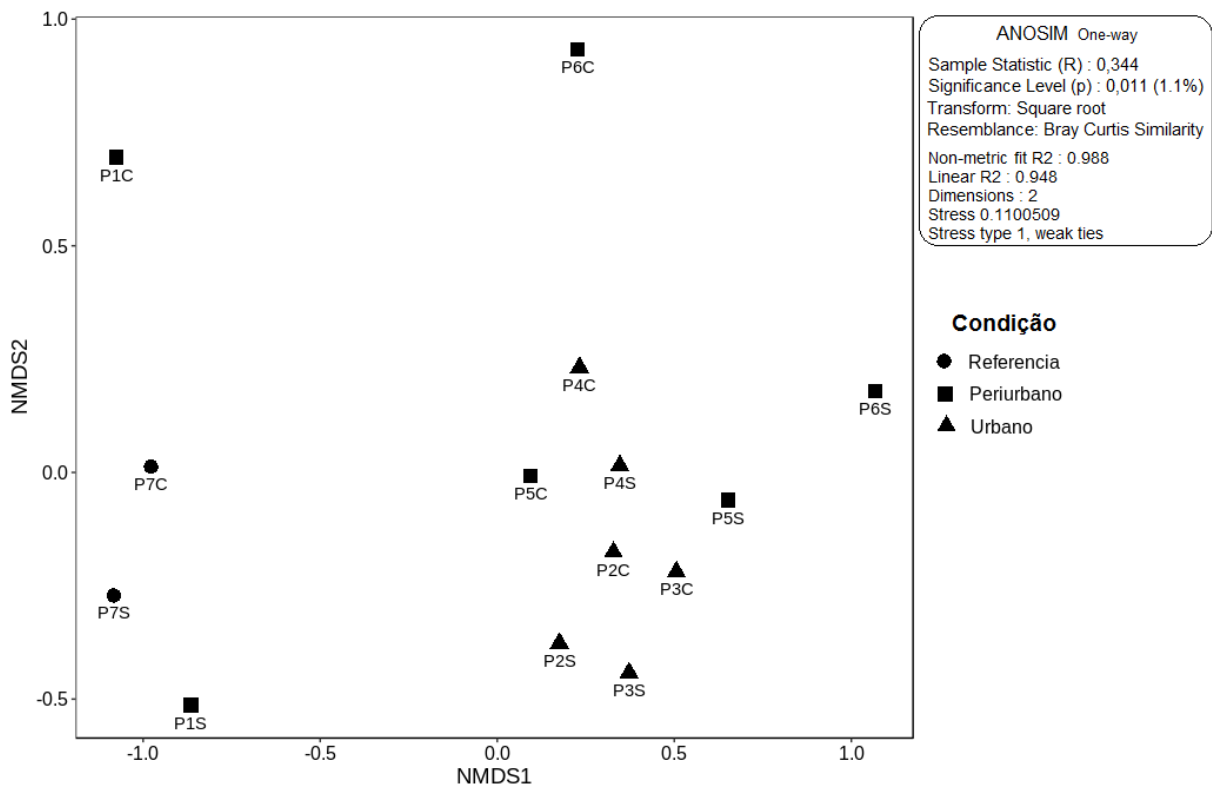


Figura 10. Ordenação NMDS dos pontos amostrais baseada na estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos nas condições referencia, periurbano e urbano dos córregos da Palha e Formação nas estações chuvosa (C) e seca (S) de 2019.

Os índices bióticos BMWP e BMWP/ASPT classificaram os pontos de referência (P7) e à montante da área urbana (P1) como “Bom” ou “Muito bom” e os pontos urbanos (P2, P3 e P4) e à jusante (P5 e P6) variaram entre “Regular” e “Ruim” (Tabela 6).

Tabela 6. Índices bióticos Biological Monitoring Working Party (BMWP) e Biological Monitoring Working Party/Average Score per Taxon (BMWP/ASPT) e classificação de qualidade da água pelo índice BMWP/ASPT dos córregos da Palha e Formação durante as estações chuvosa (Ch) e seca (Se) de 2019.

Índices	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7	
	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se	Ch	Se
BMWP	64	76	24	33	22	41	30	35	32	17	30	31	117	125
BMWP/ASPT	5.8	5.8	4	3.6	3.6	4.1	3.7	3.8	4	3.4	3.7	3.8	5.8	6.2
Qualidade da água (BMWP/ASPT)	Boa	Boa	Regular	Ruim	Ruim	Regular	Ruim	Ruim	Regular	Ruim	Ruim	Ruim	Boa	Muito boa

4.5. Peixes

Nos pontos P1 e P7 foram encontrados apenas peixes da espécie *Astyanax bimaculatus* Linnaeus 1758 (Characiformes: Characidae), enquanto em P3, P4, P5 e P6 somente a espécie *Poecilia reticulata* Peters 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) foi observada (Figura 11). O ponto urbano P2 foi o único em que não houve registro de peixe.

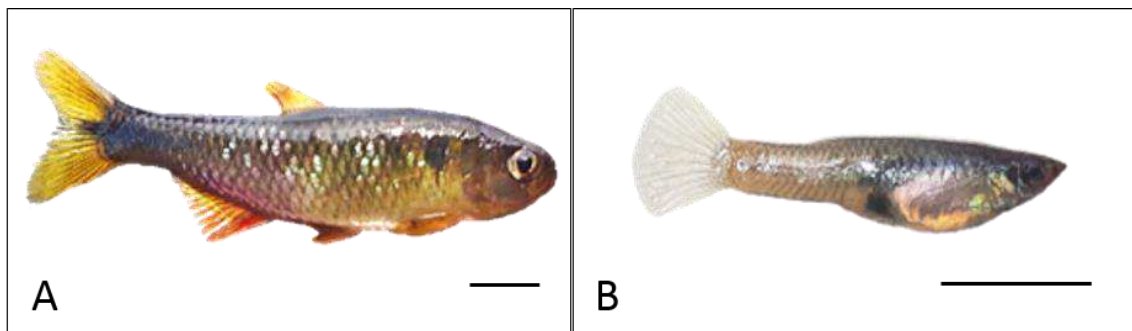


Figura 11. Peixes coletados no Córrego da Palha e Córrego Formação: (A) *Astyanax bimaculatus*; (B) *Poecilia reticulata*. Barra: 1cm.

4.5.1. Análises histopatológicas

A técnica de coloração em Hematoxilina e Eosina revelou diferentes alterações histopatológicas nos diferentes pontos amostrais e períodos pluviométricos. Em *A. bimaculatus*, encontrado nos pontos amostrais com menor impacto antrópico (P1 e P7), nenhuma histopatologia evidente foi observada (Figura 12). Já em *P. reticulata*, ocorrente nos pontos amostrados com maior impacto antrópico (P3, P4, P5 e P6), foi detectado aneurisma, congestão vascular, fusão parcial dos filamentos, fusão total dos filamentos e proliferação do epitélio filamentososo (Figuras 13 e 14).

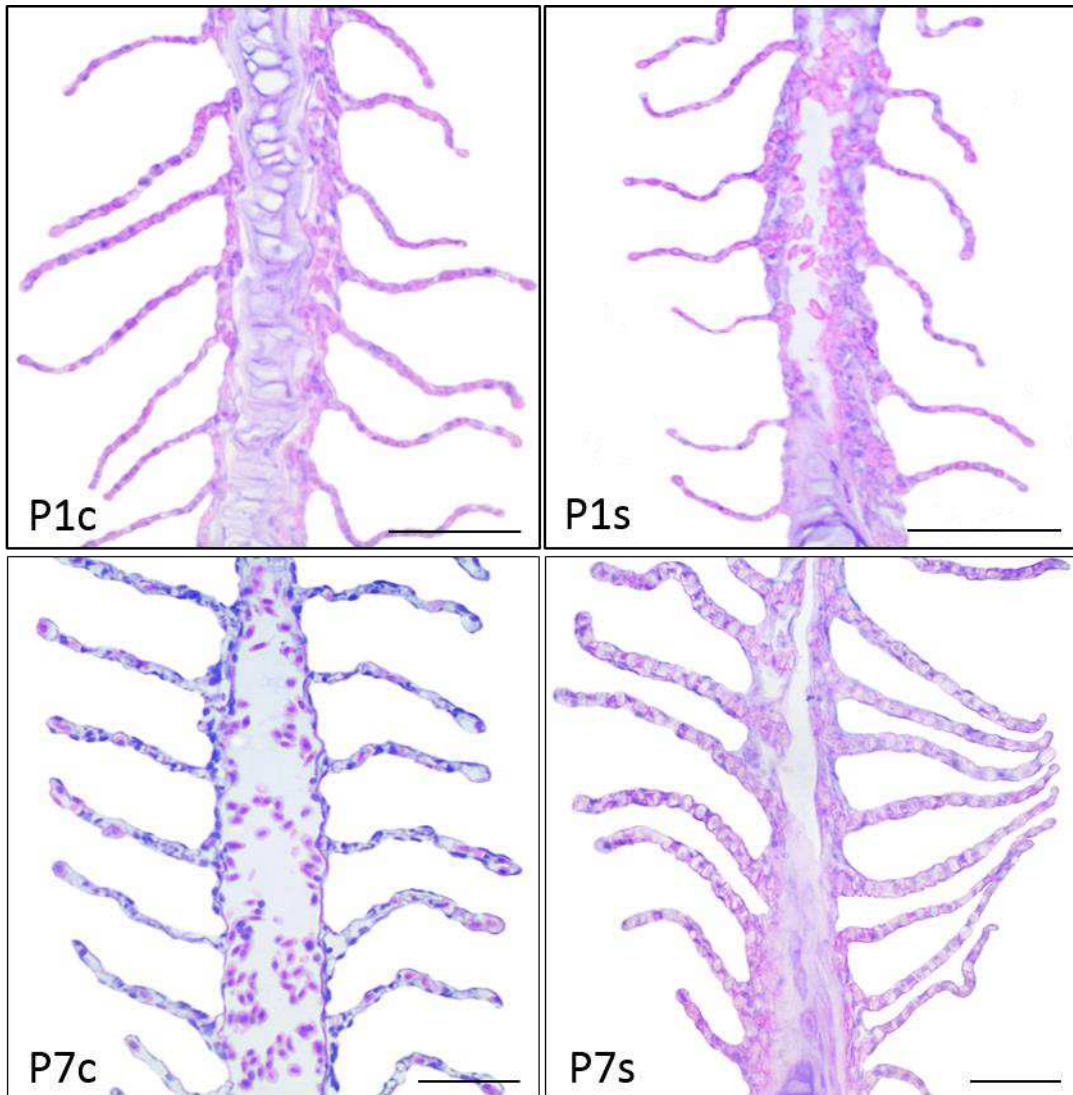


Figura 12. Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax bimaculatus* coletados nos córregos da Palha e Formação, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019. Pontos amostrais seguidos por letra minúscula indicando a estação chuvosa (c) e seca (s). Coloração em HE, Barra: 400 μ m.

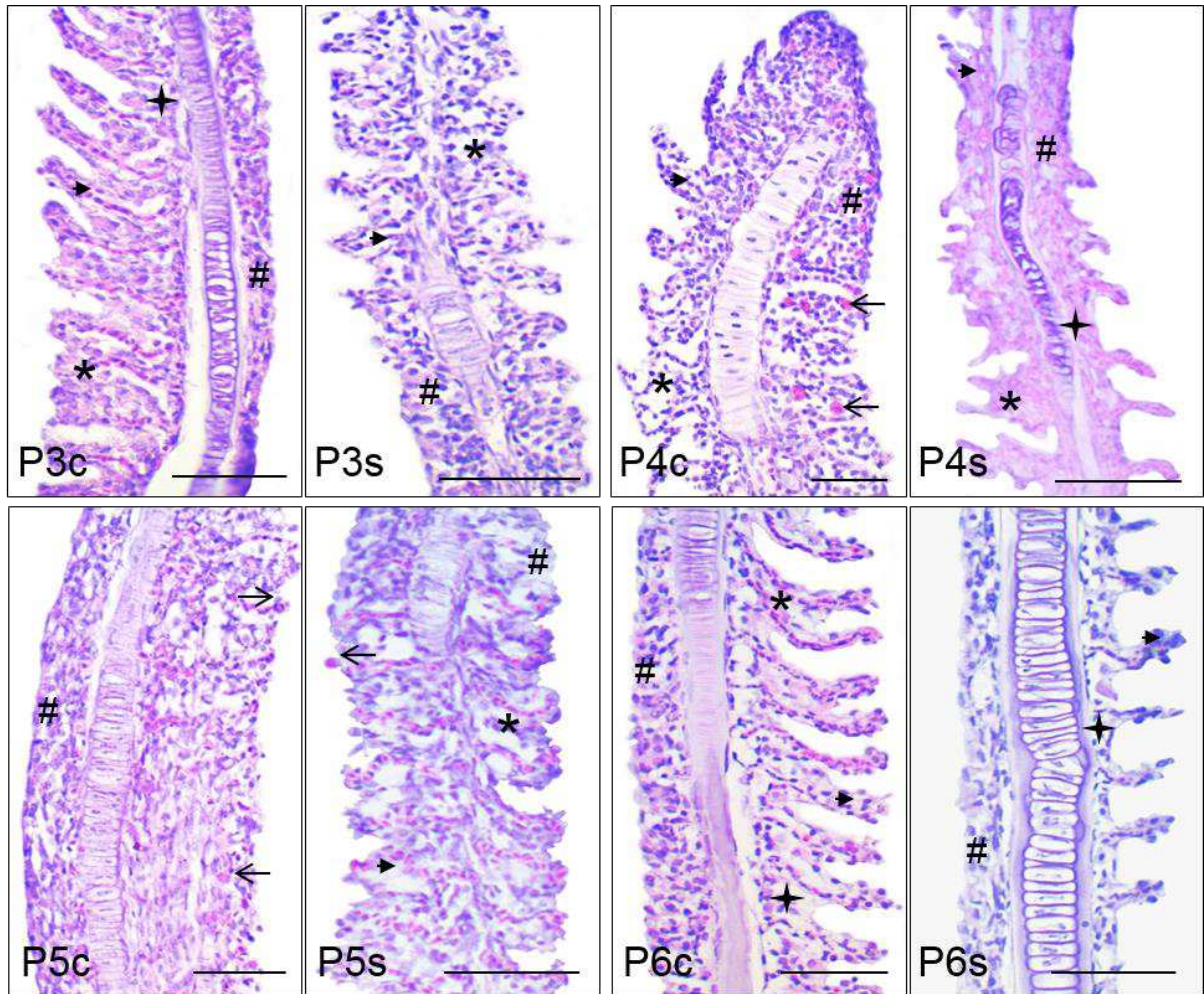


Figura 13. Fotomicrografias de brânquias de *Peocilia reticulata* coletados no Córrego da Palha, Diamantina-MG, e alterações histopatológicas presentes. Pontos amostrais seguidos por letra minúscula indicando a estação chuvosa (c) e seca (s). Histopatologias frequentes: aneurisma (seta), congestão vascular (cabeça de seta), fusão parcial dos filamentos (asterisco), fusão total dos filamentos (cerquilha), proliferação do epitélio filamentososo (estrela). Coloração em HE, Barra: 400µm.

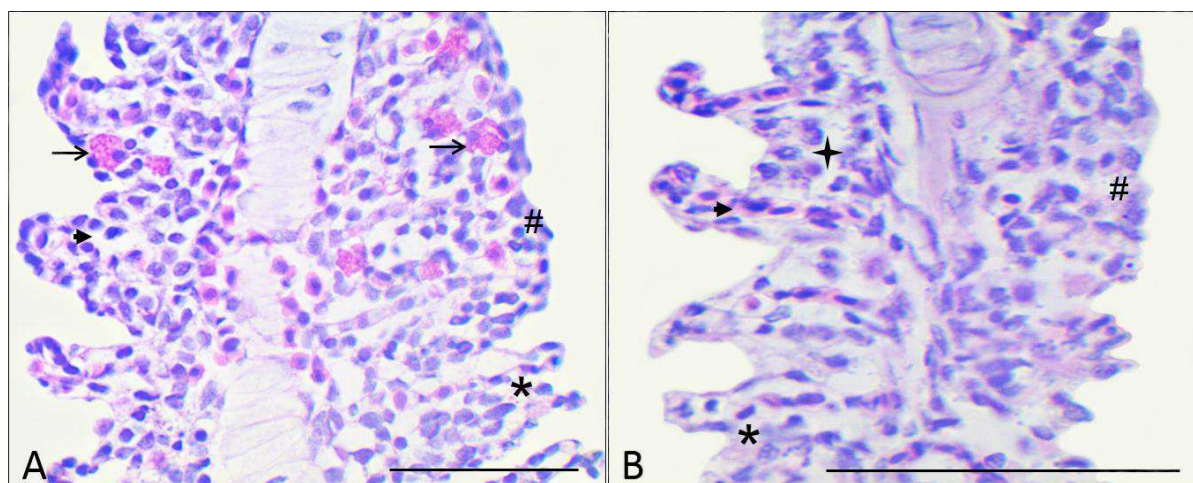


Figura 14. Fotomicrografias de brânquias de *Peocilia reticulata* coletados no Córrego da Palha, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019. (A) P4, período chuvoso. (B) P3, período seco. Histopatologias frequentes: aneurisma (seta), congestão vascular (cabeça de seta), fusão parcial dos filamentos (asterisco), fusão total dos filamentos (cerquilha), proliferação do epitélio filamentososo (estrela). Coloração em HE, Barra: 400µm.

O Índice de condição histopatológico indicou alterações morfológicas teciduais com graus distintos de severidade entre os pontos coletados (Tabela 7). A maior pontuação (9) foi encontrada em P4 no período chuvoso e P5 período seco, sendo observado as mesmas lesões em ambos os pontos. Por não apresentarem nenhum tipo de alteração histopatológica, os pontos P1 e P7 não pontuaram em ambos os períodos pluviométricos.

Tabela 7. Índice de condição histopatológico das brânquias de *Astyanax bimaculatus* e *Poecilia reticulata* coletados ao longo dos córregos da Palha e Formação nos períodos seco (S) e chuvoso (C) de 2019. Valores de severidade das alterações histopatológicas de acordo com o fator de importância histopatológico por Antunes *et al.* (2017).

Alterações Histopatológicas	P1		P3		P4		P5		P6		P7	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
Congestão vascular	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	-	-
Fusão parcial dos filamentos	-	-	2	2	2	2	-	2	2	-	-	-
Proliferação do epitélio filamentososo	-	-	2	-	-	2	-	-	2	2	-	-
Aneurisma	-	-	-	-	3	-	3	3	-	-	-	-
Fusão total dos filamentos	-	-	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-

Alterações Histopatológicas	P1		P3		P4		P5		P6		P7	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
Total	0	0	8	6	9	8	6	9	8	6	0	0

4.5.2. Análise Imuno-histoquímica

A análise de IHQ revelou a expressão imuno-histoquímica de HSP70 nas brânquias em todos os pontos e durante as duas estações pluviométricas estudadas (Figuras 15 e 16). A coloração escura, indicativa da presença da proteína avaliada, foi mais intensa durante a estação chuvosa em todos os pontos com exceção de P3, cujas brânquias apresentaram forte expressão imuno-histoquímica nas duas estações (Figura 16).

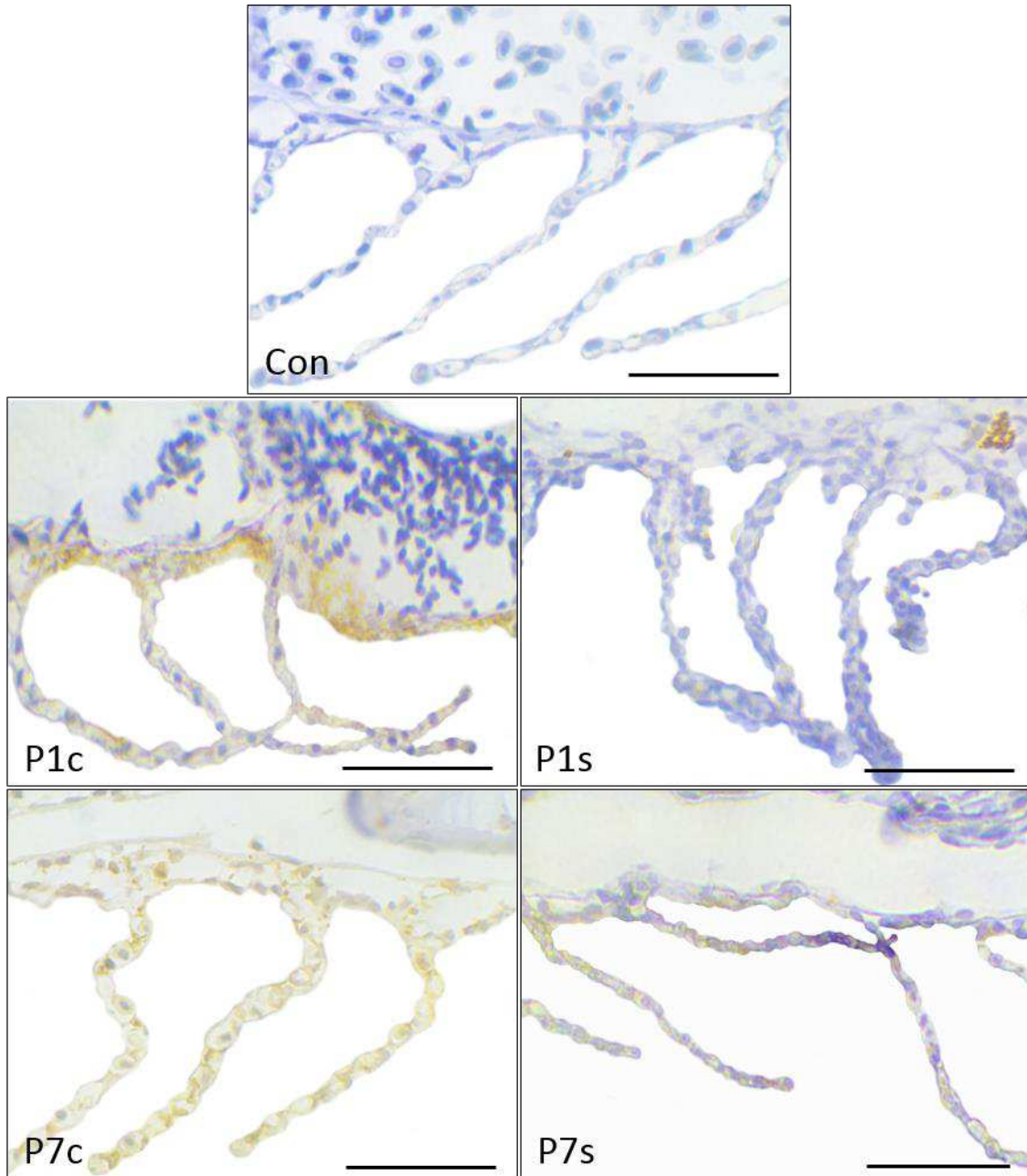


Figura 15. Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax bimaculatus*, coletados nos córregos da Palha e Formação, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019. Tecidos submetidos a imunohistoquímica com anti-HSP70 e contracolorados com hematoxilina. (Con) Controle negativo da reação. Pontos amostrais seguidos por letra minúscula indicando a estação chuvosa (c) e seca (s). Barra: 400µm.

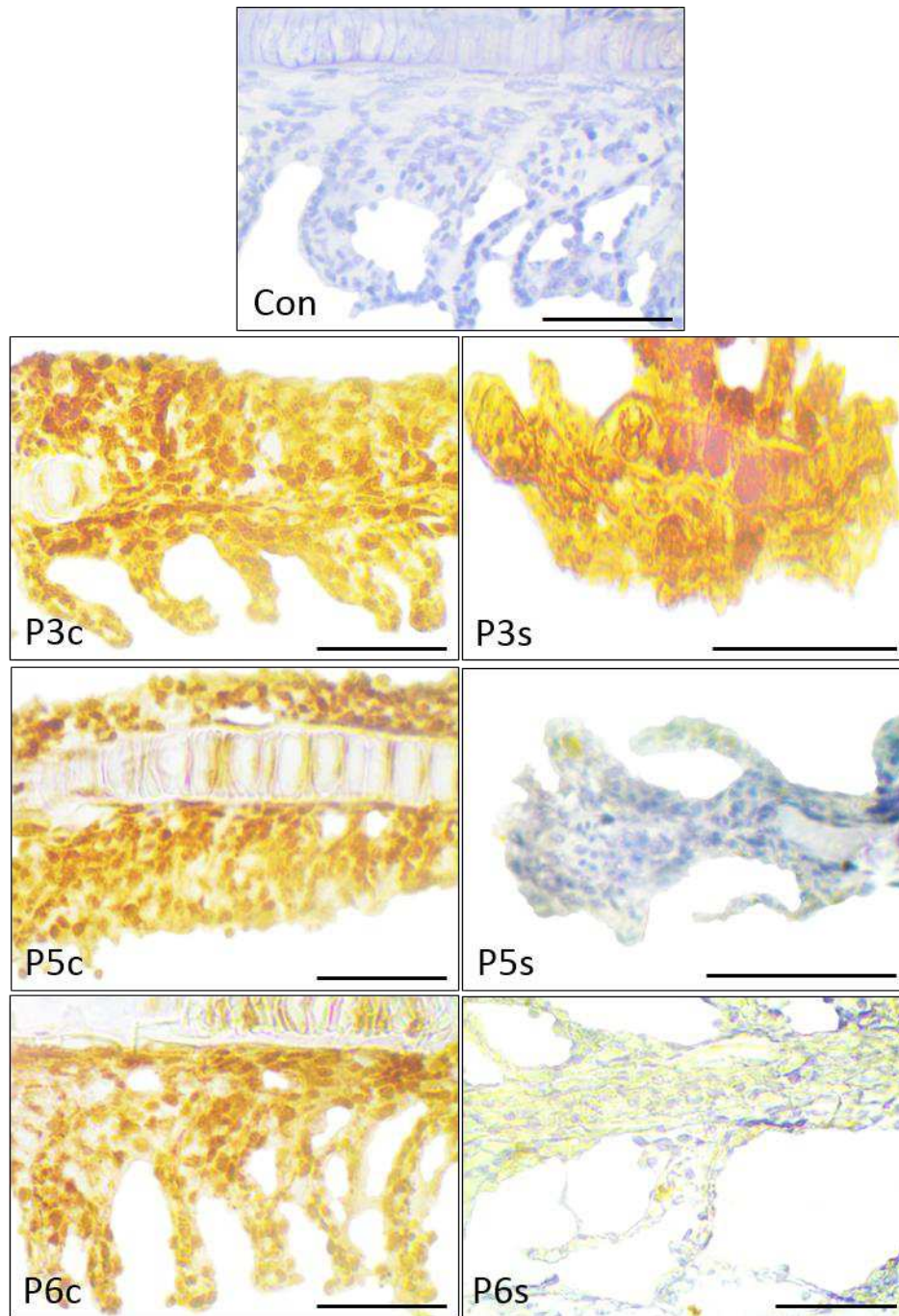


Figura 16. Fotomicrografias de brânquias de *Poecilia reticulata* coletados no Córrego da Palha, Diamantina-MG, nas estações chuvosa e seca de 2019. Tecidos submetidos a imuno-histoquímica anti-HSP70 e contracorados com hematoxilina. (Con) Controle negativo da reação. Pontos amostrais seguidos por letra minúscula indicando a estação chuvosa (c) e seca (s). Barra: 400 μ m.

5. DISCUSSÃO

As características ambientais da água e entorno, bem como a biota analisada em seus diferentes níveis durante as duas estações pluviométricas, nos permite observar o impacto negativo causado pela urbanização do município de Diamantina sobre o Córrego da Palha. Esse impacto gera uma queda na qualidade ambiental do curso d'água em sua porção urbana, que se mantém à jusante dessa área, e apresenta sinais de recuperação no trecho avaliado mais distante à jusante. Discutiremos cada parâmetro de análise da qualidade do córrego, respeitando a ordem dos resultados.

5.1. Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats

A qualidade dos trechos amostrados através do PARDH cai vertiginosamente à medida que o Córrego da Palha atravessa a área urbana, apresentando uma melhora discreta nos pontos à jusante. Nossos resultados se assemelham com os de Padovesi-Fonseca *et al.* (2010) que observaram baixa integridade ambiental nas áreas urbanas de um rio em Planaltina-DF e aumento da qualidade quanto mais o curso d'água se distanciava da urbanização. Os autores destacam que a influência da urbanização sobre a margem e o leito do córrego, como o lançamento de efluentes, é evidenciada através do PARDH.

Os pontos periurbanos e de referência (P1, P5, P6 e P7) apresentaram pouca variação na pontuação entre as estações, sendo classificados como naturais ou alterados. Com exceção de P6, essas áreas obtiveram maior pontuação durante a estação seca. A preservação das características físicas do leito, vegetação e ausência de ocupação residencial nas margens contribuíram para o maior escore na seca, assim como encontrado por Pinto, Oliveira & Valente (2020). O ponto 1, localizado próximo à cabeceira do córrego em área de tombamento estadual, obteve pontuações semelhantes aos do ponto de referência, demonstrando seu elevado grau de preservação ainda que possua em sua proximidade vias e influência antrópica. Os pontos urbanos (P2, P3 e P4) tiveram grande variação entre os períodos avaliados, sendo classificados como alterados durante o período chuvoso e como impactados no período seco. Distúrbios antrópicos como oleosidade e transparência da água, presença de lama no fundo e erosão das margens foram mais acentuados nesses trechos durante a época seca, contribuindo para seus escores baixos nesse período. As condições encontradas nos pontos urbanos foram similares a outros estudos que avaliaram rios sob influência antrópica, com baixas pontuações no PARDH

refletindo alterações ocorrentes no leito e margens, como a maior concentração de efluentes domésticos (KRUPK, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018).

5.2. Parâmetros Físico-Químicos

A variável ambiental de temperatura é fundamental na dinâmica biológica dos organismos aquáticos, uma vez que determina a velocidade de processos biogeoquímicos (WARD *et al.*, 2013). De acordo com Baggio, Freitas & Araujo (2016), ela também regula outros parâmetros físico químicos da água. A variação nos valores médios de temperatura ao longo do Córrego da Palha no período chuvoso ficou entre 22,01°C e 25,95°C, e entre 17,8°C e 24,3°C no período seco, época com maior amplitude térmica. Entre os períodos, a temperatura média foi maior na estação chuvosa (24,03°C) que na seca (21,32°C). Vários fatores como profundidade do leito, velocidade da água, horário da amostragem e sombreamento da mata ciliar influenciam diretamente nos valores de temperatura (BARROS *et al.*, 2019).

As áreas urbanas obtiveram pH mais elevado que as áreas com menor influência antrópica. Em P1 o pH foi o menor dentre os pontos amostrais do córrego, valores significativamente semelhantes aos do ponto de referência. O pH sofre um acréscimo de valor nos trechos ao longo da área urbana e queda nos pontos periurbanos à jusante, retornando a valores baixos em P6. Outros trabalhos com achados semelhantes discorrem sobre o impacto causado pelo lançamento de efluentes no pH dos rios, ocasionando aumento no pH em regiões urbanizadas (CORDEIRO *et al.*, 2016).

O pH médio da estação chuvosa (6,85) foi levemente maior que o da seca (6,46). Em P1 e P6, com menor influência urbana, o maior fluxo d'água, presença de mata ciliar e o carreamento pluvial de material vegetal para o leito do córrego podem explicar o menor pH durante a estação chuvosa. A presença de ácidos húmicos, oriundos de decomposição vegetal, contribuem com a queda de pH da água (BRASIL, 2014). Já os pontos com maior urbanização apresentaram valores de pH menores durante o período seco. A menor diluição de compostos em suspensão na água pela ausência de chuvas, explica valores baixos de pH em períodos de estiagem (SILVA *et al.*, 2008). Outro estudo realizado no Córrego da Palha também encontrou valores menores de pH durante a época seca, responsabilizando a menor diluição de material orgânico somado ao lançamento de efluentes domésticos no leito (BARROS *et al.*, 2019). Outros trabalhos também atribuem a menor vazão de água durante o período seco como responsável por valores baixos de pH (HABERLAND *et al.*, 2012; NOZAKI *et al.*, 2014).

As taxas de oxigênio dissolvido (OD) sofrem uma grande queda quando o Córrego da Palha atravessa a área urbana de Diamantina. Em ambos os períodos a concentração de oxigênio em P1 é próxima do ponto referencial, caindo drasticamente e mantendo uma homogeneidade nos pontos urbanos em sequência. Ao alcançar P6, ponto periurbano mais distante da área urbana, a concentração se torna significativamente semelhante aos valores de P1, evidenciando o impacto da região urbana sobre o Córrego da Palha e também o processo de depuração nesse ponto (COSTA & TEIXEIRA, 2010). Esse resultado corrobora o estudo de Barros *et al.* (2019) que encontraram valores extremamente baixos de OD na área urbana do Córrego da Palha. Outros trabalhos como os de Siqueira, Aprile & Miguéis (2012), Baggio, Freitas & Araujo (2016) e Cordeiro *et al.* (2016) também evidenciam a forte influência urbana na queda dos níveis de OD em rios.

Durante a época seca P1 apresentou o maior valor médio de OD no Córrego da Palha (6,66 mg/l) registrando logo em seguida, em P2, o menor valor médio do córrego (1,97 mg/l). Os pontos com menor grau de urbanização obtiveram maiores taxas de OD na estação seca, porém com pouca variação entre as duas épocas. Já os pontos com maior influência urbana apresentaram maiores valores de OD durante o a estação chuvosa, com grande variação entre as épocas. A turbulência gerada na água durante eventos de chuva aumenta a troca de gases entre a água do rio e o ar, elevando os índices de oxigênio dissolvidos em períodos chuvosos (Pereira *et al.*, 2010), o que pode explicar maiores valores encontrados durante a chuva nos pontos urbanos.

Os níveis de OD influenciam toda a biota presente em um córrego (WAITE *et al.*, 2019). Quando extremamente baixos ($>2\text{mg/L}$) podem ser fator limitante na sobrevivência de peixes, afetando respostas fisiológicas como a diminuição de imunidade e resultando na morte de indivíduos (ABDEL-TAWWAB *et al.*, 2019). Eventos de mortes em massa de peixes são comumente relacionados a baixa oxigenação da água (POLLOCK, CLARKE & DUBÉ, 2007). Nas comunidades de macroinvertebrados bentônicos valores baixos de OD resultam em diminuição da riqueza de táxons e dominância de espécies tolerantes (JACOBSEN, 2008; WAITE *et al.*, 2019). Devido aos valores muito baixos encontrados nos pontos urbanos era esperado uma condição limitante de sobrevivência dos organismos que habitam esses pontos. Isso pôde ser confirmado através dos bioindicadores com a ausência de peixes em P2 (DE SOUZA & TOZZO, 2013), lesões e superexpressão histoquímica de HSP70 nas brânquias

(SALES *et al.*, 2017), além da baixa riqueza e dominância de táxons tolerantes de macroinvertebrados bentônicos nesses pontos (CORDEIRO *et al.*, 2016).

5.3. Análises Microbiológicas

Nos testes de coliformes totais e termotolerantes houve variação nos valores de NMP/100ml entre os períodos chuvoso e seco apenas no ponto amostral próximo à nascente do Córrego da Palha (P1). O NMP para coliformes totais nesse trecho foi menor durante a estação chuvosa que na estação seca. A maior pluviosidade na estação chuvosa pode explicar o baixo valor de NMP nesse período, uma vez que aumenta a diluição de material orgânico presente (BARROS *et al.*, 2019), utilizado como nutriente pelas bactérias (HABERLAND *et al.*, 2012). As bactérias não fecais desse grupo podem estar presentes no solo, são mais resistentes a agentes desinfetantes e apresentam maior sobrevivência na água que as bactérias patogênicas de origem intestinal (BRASIL, 2013). O NMP de coliformes termotolerantes em P1 foi maior na estação chuvosa que na seca, seguindo um padrão ambiental já conhecido. Com origem fecal e majoritariamente antropogênica, o grupo das coliformes termotolerantes é comumente predominante nos corpos hídricos durante períodos chuvosos devido ao carreamento de dejetos humanos, ocasionando maior concentração de material fecal no ambiente (OLIVEIRA & CUNHA, 2014; RAMOS *et al.*, 2016).

Os pontos amostrais inseridos na porção urbana do município (P2 e P4) e posterior a eles (P6) apresentaram valores máximos de NMP/100ml (1600) nos dois testes bacteriológicos e em ambos os regimes pluviométricos. Em uma análise similar, Souza *et al.* (2017) também verificaram alta carga de coliformes totais e termotolerantes na área urbana do Rio Poxim, no estado de Sergipe, e baixa carga bacteriana na área à montante da povoação. A presença elevada de bactérias termotolerantes na água é considerada um indicador seguro de contaminação fecal (DONNENBERG, 2013). Os altos valores de NMP nas zonas urbanas sugerem impacto antrópico na qualidade hídrica, oriundo do lançamento de efluentes domésticos no curso d'água (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015). Cerca de 61% dos domicílios de Diamantina despejam esgoto sanitário diretamente no Córrego da Palha (GARRAFFONI & PEREIRA, 2012). A presença de bactérias termotolerantes na área urbana do Córrego da Palha também foi confirmada por Barros *et al.* (2009) que relacionaram o achado ao lançamento de efluentes na região de drenagem.

Os resultados dos testes de coliformes termotolerantes alertam para o risco de saúde em que a população ribeirinha local está exposta. A comunidade utiliza alguns pontos ao longo do córrego para recreação e realiza plantio direto de hortaliças às margens do leito do córrego (ARAÚJO *et al.*, 2016). A realização dessas atividades somadas ao despejo de dejetos sanitários domésticos no curso fluvial pode acarretar não apenas em problemas relacionados às bactérias do grupo coliformes, bem como ocasionar doenças de origem oro-fecal com veiculação hídrica pela água não tratada do rio (LIU *et al.*, 2012).

5.4. Macroinvertebrados Bentônicos

A comunidade de macroinvertebrados no Córrego da Palha foi representada em sua maioria por famílias de insetos (92%), o que é comumente relatado em estudos que destacam a predominância numérica desse grupo na fauna de macroinvertebrados aquáticos (RIBEIRO & UYEDA, 2005; SANTOS *et al.*, 2017). Também avaliando a comunidade de macroinvertebrados no Córrego da Palha em Diamantina-MG, Viana (2018) observou quase totalidade de insetos dentre os espécimes amostrados (97%).

A maior abundância de macroinvertebrados encontrada durante a estação seca também foi observado por Bispo *et al.* (2006) e Thomazi *et al.* (2008). A precipitação pluviométrica contribui com a flutuação da abundância e riqueza de táxons dos macroinvertebrados bentônicos, tornando a estrutura das comunidades durante a estação seca mais estáveis (ABÍLIO *et al.*, 2006).

A família Chironomidae (Diptera) foi o táxon mais dominante, representando quase 70% dos espécimes. A alta abundância e dominância desse grupo é relatado por outros autores (DOCILE *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; DE SOUZA, MUNIZ & OLIVEIRA JUNIOR, 2018) que destacam a presença dessa família nos diferentes tipos de ambientes estudados, principalmente em áreas urbanizadas (MENEZES *et al.*, 2019). Muitas espécies de quironomídeos apresentam hemoglobina em seus corpos, o que lhes confere grande resistência em áreas com pouco oxigênio dissolvido (MURRIETA-MOREY, NÁJAR & ALCANTARA-BOCANEGRA, 2016). A dominância de Chironomidae encontrada nos pontos urbanos corrobora os resultados de Viana (2018) que, avaliando a comunidade de macroinvertebrados no mesmo Córrego da Palha, relatou abundância total de 94% de Chironomidae entre os espécimes encontrados em pontos urbanos.

A família Psychodidae (Diptera) apresentou a segunda maior abundância dentre os táxons amostrados (5,3%). Encontrada principalmente nos pontos urbanos, foi o grupo mais abundante em P2 durante a estação seca. Muito tolerantes à poluição, a alta abundância de psicodídeos no ambiente é associada a condições de urbanização (MARTINS *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2019). Avaliando áreas urbanas e não urbanas de um córrego, Menezes *et al.* (2019) também encontraram alta abundância de Psychodidae em amostras de pontos urbanos.

As famílias Baetidae (Ephemeroptera) e Hydroptilidae (Trichoptera) representaram respectivamente 4,5% e 3,7% dos espécimes totais e foram mais abundantes no ponto referencial. Elas integram o grupo EPT (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera), formado por três ordens de insetos aquáticos com alta sensibilidade à poluição, frequentemente utilizado como bioindicador de boa qualidade ambiental (CRISCI-BISPO, BISPO & FROEHLICH, 2007; SIEGLOCH *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2017; LOU *et al.*, 2018; MENEZES *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2020).

Os anelídeos da subclasse Oligochaeta corresponderam a 3,9% da abundância total de macroinvertebrados. São considerados organismos resistentes à poluição além de participarem no processo de ciclagem da matéria orgânica (GOULART & CALLISTO, 2003). Assim como outros trabalhos (SANTOS *et al.*, 2017; MENEZES *et al.*, 2018; VIANA, 2018) os oligoquetos foram encontrados em diferentes tipos de ambientes, com maior abundância nas áreas urbanas e periurbanas.

A família Simuliidae (Diptera) representou 2,7% do total de espécimes, com maior abundância nos pontos de referência e periurbanos. Em seu estudo, Docile *et al.* (2016) encontraram alta abundância de Simuliidae com preferência em áreas com condições intermediárias de qualidade ambiental. De acordo com os autores supracitados, os simulídeos sobrevivem em diferentes condições ambientais por apresentam tolerância a hipóxia e alimentação baseada em detritos de matéria orgânica em suspensão.

Os representantes da família Elmidae (Coleoptera) foram 1,7% dos espécimes coletados. Presentes mais abundantemente no ponto referencial, esses coleópteros são comumente encontrados em rios bem preservados e com boa qualidade ambiental (BRAUN *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2017; STUBBINGTON *et al.*, 2019).

Os táxons Collembola (Entognatha) e Hydracarina (Acari) representaram 1,5% cada um do total das amostras. Enquanto os colêmbolos foram encontrados apenas nos pontos urbanos e periurbanos, os ácaros e a família Chironomidae foram os únicos presentes em todos os pontos e estações amostrados. Colêmbolos costumam ser encontrados em maior quantidade em ambientes urbanos (PETERSON *et al.*, 2017), enquanto diferentes gêneros de Hydracarina ocupam habitats com graus variados de antropização (GOLDSCHMIDT, HELSON & WILLIAMS, 2016).

O ponto referencial apresentou a maior diversidade, abundância e exclusividade de táxons, especialmente do grupo EPT. A alta diversidade de táxons em um rio é relacionada à ausência de impactos antropogênicos, enquanto a baixa riqueza geralmente indica distúrbios como poluição (AZRINA *et al.*, 2006). Mudanças na estrutura do ambiente como a retirada de cobertura vegetal afetam a biota aquática, incluindo diminuição da diversidade de EPT (CASTRO *et al.*, 2020). Em estudo realizado na mesma bacia, GARRAFONI 2013 identificaram maior riqueza, abundância e exclusividade de táxons de EPT em pontos amostrais com condições naturais que em pontos com algum grau de distúrbio antrópico. A alta diversidade taxonômica encontrada na condição periurbana foi majoritariamente exclusiva de P1, com a presença de famílias de EPT e Odonata que apresentam forte relação com a ausência de poluição (FREEMAN & SCHORR, 2004) e presença de vegetação ripária (PIRES *et al.*, 2020), característicos desse ponto amostral. Os pontos urbanos e à jusante tiveram baixa riqueza e dominância de táxons tolerantes à poluição como as famílias Chironomidae e Psychodidae. Alta dominância e baixa diversidade de táxons são bons indicativos de cursos d'água sob influência antrópica (OMETTO *et al.* 2004). Tal resultado assemelha-se ao de Menezes *et al.* (2019) que, ao avaliar um rio sob influência urbana em Lavras-MG, encontraram dominância dessas duas famílias de dípteros.

O resultado da ANOSIM indicou que há relação entre a distribuição dos macroinvertebrados bentônicos e a condição de ambiente do ponto amostrado. A distribuição da fauna bentônica segue as condições ambientais em que se encontra inserida (MENEZES *et al.*, 2019), apresentando alta complexidade e riqueza em áreas de condição natural preservadas e baixa quando há a presença de poluentes, como ocorre em áreas urbanas (MOREYRA & PADOVESI-FONSECA, 2015). Essa relação pôde ser melhor observada através da NMDS, onde os padrões espaciais demonstram a maior proximidade existente entre as estruturas da comunidade dos pontos de referência e à montante da área urbana (P1C e P1S), com menor

distúrbio antrópico, e entre os pontos urbanos e periurbanos à jusante, impactados pela urbanização. Córregos situados em áreas urbanas estão sujeitos a maior degradação causada pela poluição, o que pode alterar a estrutura da comunidade aquática e diferenciá-la das encontradas em condições naturais (BAKER & KING, 2010; CASTRO *et al.*, 2020). O ponto mais à jusante aos pontos urbanos (P6C e P6S) foi o mais disperso dentre o agrupamento, indicando diferenciação entre sua comunidade e a dos pontos com maior impacto antrópico. A estrutura da comunidade bentônica, afetada em áreas urbanas, pode ser incrementada pelo aumento da vegetação ripária (DOCILE *et al.*, 2016), o que é bastante presente em P6. Essa substituição da comunidade aquática, se aproximando da presente em condições naturais locais, é representativa e indica um provável processo de depuração da água (VON SPERLING, 2007). O acréscimo de oxigênio dissolvido à jusante da área de recepção de matéria orgânica também evidencia autodepuração nesse ponto (COSTA & TEIXEIRA, 2010).

Os índices bióticos BMWP e ASPT mostraram-se sensíveis às diferentes condições de urbanização dos pontos amostrais. Os pontos de referência (P7) e à montante da área urbana (P1), com baixa influência antrópica, foram classificados de acordo com BMWP/ASPT como ambientes de qualidade “Boa” ou “Muito boa”, refletindo a elevada riqueza de táxons presente nesses pontos. Esse resultado corrobora trabalhos como os de Yoshida & Rolla (2012) e Menezes *et al.* (2018) que apresentam escores altos e boa classificação do índice ao estudar áreas preservadas. Já os pontos urbanos (P2, P3 e P4) e à jusante (P5 e P6) foram classificados como “Regulares” ou “Ruins”, seguindo a menor riqueza e a dominância de poucos táxons encontrada nesses pontos (CARDOSO *et al.*, 2019). A degradação da qualidade ambiental em rios urbanos gera um declínio de táxons sensíveis, reduzindo a biodiversidade de macroinvertebrados (BAKER & KING, 2010), influenciando diretamente em escores baixos do índice.

5.5. Peixes

A ausência ou presença de determinados peixes em um ambiente pode ser reflexo de seu estado ambiental, tornando os peixes bons indicadores de poluições severas (DE SOUZA & TOZZO, 2013). A ausência de peixes em P2 nas duas campanhas amostrais reflete o impacto causado pela urbanização em seu entorno, com a construção de edifícios em sua margem e grande volume de esgoto despejado em seu leito. Dentre os pontos amostrados, o ponto 2 obteve a menor média de oxigênio dissolvido, tanto no período chuvoso quanto no seco. Taxas extremamente baixas de OD, como encontrada nesse ponto, são fatores limitantes para a

existência de peixes no ambiente (ABDEL-TAWWAB *et al.*, 2019). A espécie *P. reticulata* foi a única ocorrente na área urbana e à jusante, possivelmente pela sua elevada resistência à baixa qualidade ambiental e dominância sobre outras espécies de peixes menos resistentes (DE SOUZA & TOZZO, 2013). Já *A. bimaculatus*, encontrada nos pontos com melhor preservação ambiental, vêm sendo utilizada nos últimos anos em estudos envolvendo biomarcadores de poluição ambiental (BATISTA *et al.*, 2019; NUNES & JESUS, 2019) se demonstrando sensível a impactos antrópicos.

As espécies do gênero *Astyanax* apresentam grandes semelhanças morfológicas, ecológica e comportamentais (GURGEL, 2004). Bastante comuns em rios de todo o Brasil, são frequentemente utilizadas em estudos de biomonitoramento, principalmente em eventos de poluição ambiental com origem antrópica devido sua alta sensibilidade (NIMET, GUIMARÃES & DELARIVA, 2017; TOLUSSI *et al.*, 2018; FRANCISCO *et al.*, 2019; WACHTEL *et al.*, 2019). Vários trabalhos apontam a espécie *A. bimaculatus* como boa bioindicadora de contaminação pluvial por diferentes tipos de contaminantes. Estudando os efeitos do esgoto sobre um rio na Colômbia, Corredor-Santamaría, Torres-Tabares & Velasco-Santamaría (2019) encontraram alterações histológicas severas em brânquias de *A. bimaculatus* coletados no trecho urbano, área com grande despejo de efluentes. No Brasil, Bisognin *et al.* (2020) avaliaram os efeitos de fármacos de efluentes com e sem tratamento em diferentes órgãos de *A. bimaculatus*, na cidade de Porto Alegre. Os autores encontraram alterações metabólicas, como estresse oxidativo elevado, nos peixes expostos ao efluente *in natura* e alterações menos severas nos peixes em contato com efluentes tratados, evidenciando o impacto da poluição urbana sobre a ictiofauna. Após observarem alterações histopatológicas profundas em brânquias de *A. bimaculatus* causadas pela exposição ao zinco, Santos *et al.* (2012) reforçam que a espécie se apresenta como uma excelente indicadora de poluição ambiental por metais pesados.

A espécie *P. reticulata*, encontrada em P3, P4, P5 e P6, é originária do Caribe e Norte da América do Sul. Introduzida em rios de todo o Brasil, é utilizada como peixe ornamental em aquários (DEACON, RAMNARINE & MAGURRAN, 2011). Em ambientes com baixos níveis de oxigênio dissolvido, como nos pontos urbanos e periurbanos à jusante da cidade, esse poecilídeo apresenta grandes vantagens competitivas por ser altamente tolerante, excluindo possíveis predadores não adaptados à esta condição ambiental e colonizando sem maiores dificuldades esses sítios (DE SOUZA & TOZZO, 2013). Apesar de exótica a espécie é

destacada como agente de controle biológico por possuir comportamento alimentar larvívoro e consumir formas imaturas de dípteros transmissores de doenças humanas (DUA *et al.*, 2007; KUSUMAWATHIE *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2016; SHAFIQUE *et al.*, 2019). Estudos como os de El-Sabaawi *et al.* (2016) e Fernando *et al.* (2018) alertam sobre os riscos da introdução, estabelecimento e impactos de *P. reticulata* sobre a biodiversidade de ecossistemas locais e defendem a opção do uso de peixes nativos como agentes de controle zoonótico.

5.5.1. Análises histopatológicas

Ainda que as histopatologias encontradas nesse estudo possam ocorrer nos dois grupos de peixes coletados (GOMES *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2017), as brânquias de *A. bimaculatus* presentes em P1 e P7 não apresentaram nenhuma alteração evidente, refletindo a boa qualidade da água nesses pontos (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; CARVALHO NETA *et al.*, 2014).

As lesões histopatológicas encontradas em *P. reticulata* têm origem associada ao estresse por poluentes, o que também explica a ausência de lesões em *A. bimaculatus*, encontrado em pontos com ausência de poluição por efluentes (P1 e P7) (CARVALHO NETA *et al.*, 2014). O fusionamento de filamentos secundários e aumento da área tecidual são respostas fisiológicas ao estresse ocasionado pelos baixos níveis de OD nos trechos urbanos, aumentando a capacidade de obtenção e consumo de oxigênio nessas condições (GAULKE *et al.*, 2014). Os aneurismas encontrados podem também ter relação com a pouca oxigenação da água. A vasodilatação ocasionada pela condição de hipóxia pode gerar a ruptura de células pilares do filamento, causando aneurismas (PEREIRA *et al.*, 2014).

Ainda que a média de OD tenha sido menor na época seca, as alterações histológicas em brânquias de *P. reticulata* foram mais acentuadas durante o período chuvoso. Além de OD outros fatores químicos não avaliados neste estudo, como por exemplo metais pesados e agrotóxicos, podem contribuir na configuração das lesões branquiais (SANTANA & CAVALCANTE, 2016). De Lima Cardoso *et al.* (2018) também encontraram um maior volume de lesões biomarcadoras em peixes durante o período chuvoso. No estudo realizado em um corpo hídrico com descarga de esgoto e presença de metais pesados, os autores supracitados sugerem que os eventos pluviométricos tornam o curso d'água mais suscetível a variações ambientais que geram estresse na ictiofauna.

Os valores totais observados no índice de condição histopatológico indicaram a maior pontuação em P4 (17), seguido de P5 (15). Os pontos P3 e P6 obtiveram a mesma pontuação (14). Esses valores revelam o elevado grau de impacto no tecido branquial dos peixes presentes na área urbana e à jusante da mesma. Para Camargo & Martinez (2007) lesões branquiais de peixes de rios urbanos, como encontradas em nosso estudo, são respostas diretas da contaminação ambiental presente nesses locais. Por estarem localizados em região próxima a porção final da mancha urbana, os peixes de P4 e P5 tendem a ter contato com maior carga de efluentes domésticos acumulados durante a passagem do córrego em toda a extensão da cidade (CAMARGO & MARTINEZ, 2007). Já P1 e P7 não apresentaram nenhuma alteração em nenhuma época, refletindo a boa qualidade ambiental e o mínimo de estresse sobre a morfohistologia branquial existente nos pontos. Esse resultado corrobora trabalhos como os de Camargo & Martinez (2007), Carvalho Neta *et al.* (2014) e De Lima Cardoso *et al.* (2018) que encontraram pouca ou nenhuma lesão em brânquias de peixes em áreas preservadas e várias lesões em peixes de áreas urbanas.

5.5.2 Análise imuno-histoquímica

As análises de IHQ revelaram maior expressão imuno-histoquímica de HSP70 durante o período chuvoso que no seco. Nos pontos com menor impacto antrópico (P1 e P7) a presença de HSP70 nas brânquias de *A. bimaculatus* foi discretamente diferente entre os dois períodos estudados, sendo mais acentuada na estação chuvosa, época com menor média de OD nos pontos. Estudos recentes em diversos tipos de células e espécies de animais relacionam o estado de hipóxia com a superexpressão de HSP70 (NIE *et al.*, 2018; LI, LI & REN, 2019; TRIPP-VALDEZ *et al.*, 2019; KARAMOOZIAN, DEHESTANI, & BEHJATMANESH-ARDAKANI, 2020), incluindo peixes (EKAMBARAM & NARAYANAN, 2017; ABARIKE *et al.*, 2020). As brânquias dos peixes dos pontos urbanos e à jusante também indicaram a presença mais intensa de HSP70 no período chuvoso. O grande aporte de poluentes domésticos nessa região contribui para o estresse celular e superexpressão imuno-histoquímica da HSP70 (EKAMBARAM, PARASURAMAN, & JAYACHANDRAN, 2016). Por esse motivo, com as chuvas, os efluentes urbanos podem chegar com maior intensidade nesses pontos, ocasionando maior presença de HSP70 nos tecidos durante este período. Em P3, local com lançamento direto de efluentes domésticos, a análise imuno-histoquímica demonstrou a presença elevada de HSP70 nas brânquias nas duas estações. A presença de xenobióticos na água, também oriundos da efluentes sem tratamentos, causa estresse tecidual e ocasiona a superexpressão de HSP70

(EKAMBARAM & NARAYANAN, 2017), modulando processos citoprotetores como o redobramento de proteínas que aproximam a homeostase celular (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ & VALPUESTA, 2018).

A expressão imuno-histoquímica de HSP70 nas brânquias de *A. bimaculatus* nas áreas pouco impactadas foi exclusivamente na região citoplasmática. Já as brânquias de *P. reticulata*, nos pontos com maior impacto, a proteína ocorreu tanto no citoplasma como no núcleo celular. O deslocamento dessas proteínas para a região nuclear é um modo de proteção celular de proteínas ribonucleicas, fundamentais na homeostase da célula (CARDOSO *et al.*, 2015). Em condições de grande estresse, a superexpressão da HSP70 na região nuclear ocorre devido sua função na importação e reparo de outras proteínas e desagregação de agregados proteicos. Em sequência, a HSP70 transloca e distribui-se em todo o citoplasma, o que indica o retorno homeostático celular (MUTHUSWAMY *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados encontrados, as ferramentas de avaliação das características ambientais e bioindicadores se mostraram eficientes para a caracterização ambiental do Córrego da Palha em um gradiente de urbanização. É significativo o impacto presente no córrego na área urbana do município de Diamantina, com piores resultados das diferentes análises nos pontos urbanos e à jusante do que à montante e referência.

Os resultados físico-químicos e o PARDH caracterizaram o ponto à montante da área urbana, com valores de OD e pH próximos aos do local de referência, como natural e os pontos urbanos e à jusante, com valores baixos de OD e pH, como alterados ou impactados, em piores condições na estação chuvosa.

As análises microbiológicas revelaram a presença de bactérias dos grupos coliformes totais e termotolerantes ao longo de todo o percurso do córrego, com baixa carga no ponto anterior à área urbana e alta carga nos pontos urbanos e à jusante.

A avaliação da comunidade de macroinvertebrados bentônicos revelou nos pontos urbanos e à jusante baixa riqueza e dominância quironomídeos, característico de ambientes impactados, e foram classificados como regulares ou ruins pelo índice BMWP/ASPT. O ponto à montante da urbanização apresentou alta riqueza de táxons, incluindo o grupo EPT, com estrutura mais próxima do ponto referencial, classificados como bons ou muito bons pelo BMWP/ASPT. A NMDS demonstrou a separação espacial da comunidade entre um grupo

formado pelo ponto referencial e ponto anterior à área urbana e outro grupo composto pelos pontos urbanos e à jusante.

Foi verificada a presença de peixes da espécie *Astyanax bimaculatus* nos pontos de referência e à montante da área urbana e de *Poecilia reticulata* nos pontos urbanos, com exceção de P2 onde não foi encontrado peixes. As análises histológicas revelaram a ausência de alterações histológicas nas brânquias dos peixes de *A. bimaculatus* (P1 e P7) e diversas lesões branquiais em *P. reticulata* (presente nos pontos urbanos e à jusante), com maior severidade na estação chuvosa. A IHQ mostrou a expressão imuno-histoquímica de HSP70 nas brânquias de todos os pontos, com menos intensidade em *A. bimaculatus* que *P. reticulata*. Nos pontos urbanos e à jusante a expressão imuno-histoquímica foi mais intensa durante a estação chuvosa que na seca.

Dessa forma, o Córrego da Palha apresenta boa qualidade ambiental anterior à região urbana e baixa qualidade na área urbanizada, refletindo o impacto causado pela urbanização. Os pontos à jusante da região urbana tiveram incremento na qualidade ambiental à medida que se distanciaram da área urbanizada.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram o impacto que a área urbana do município de Diamantina gera no estado ecológico de um dos seus principais rios, e devem servir de subsídio para elaboração e prática de políticas públicas que visam proteger o bem estar do rio, sua biota e a população diamantinense.

Levar o conhecimento sobre o córrego da Palha para a população do município de Diamantina é importante para a conscientização socioambiental e o seu próprio papel no ecossistema. Nesse contexto, envolver a comunidade através da educação ambiental a tornará aliada nos processos e ações de proteção e conservação desse rio urbano. Para isso, a elaboração de uma cartilha pedagógica ilustrada sobre as bactérias, os macroinvertebrados bentônicos e os peixes presentes nos rios urbanos de Diamantina, através dos achados desse e de outros trabalhos realizados no município, pode ser uma ferramenta útil em intervenções didáticas, feiras, exposições e projetos de extensões realizados nas escolas da região. Além disso, é importante apresentar e cobrar melhoria dos gestores municipais acerca do impacto da área urbana de Diamantina sobre o córrego, incluindo a alta carga de bactérias potencialmente patogênicas. Isso poderá ser feito levando os resultados deste estudo para comissões de participação popular e de fiscalização, como é o caso do Conselho Municipal de Saúde de

Diamantina, servindo de base para tomada de ações mitigadoras de impacto gerado pelo município.

Por fim, estudos complementares como mensuração de metais pesados na água e dados atualizados sobre lançamentos de efluentes no Córrego da Palha devem ser realizados para preencher lacunas e auxiliar na compreensão sobre o estado ecológico do córrego.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARIKE, E. D.; JIAN, J.; TANG, J.; CAI, J. SAKYI, E. M.; KUEBUTORNYE, F. K. A mixture of Chinese herbs and a commercial probiotic *Bacillus* species improves hemato-immunological, stress, and antioxidant parameters, and expression of HSP70 and HIF-1 α mRNA to hypoxia, cold, and heat stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Reports**, v. 18, n. 100438, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100438>

ABDEL-TAWWAB, M.; MONIER, M. N.; HOSEINIFAR, S. H.; FAGGIO, C. Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. **Fish physiology and biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 997-1013, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00614-9>

ABÍLIO, F. J. P.; FONSECA-GESSNER, A. A.; LEITE, R. L.; DE MELO RUFFO, T. L. Gastrópodes e outros invertebrados do sedimento e associados à macrófita *Eichhornia crassipes* de um açude hipertrófico do semi-árido paraibano. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, n. 1, p. 165-178, 2006.

AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 545-555, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>

ALVARES, C. A.; STAPE, J.; SENTELHAS, P.; GONÇALVES, J.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**. v. 22, 2013. doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507.

ANTUNES, A. M.; ROCHA, T. L.; PIRES, F. S.; FREITAS, M. A.; LEITE, V.; ARANA, S.; MOREIRA, P. C.; SABÓIA-MORAIS, S. Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 37, n. 9, p. 1098-1107, 2017. <https://doi.org/10.1002/jat.3461>

ARAUJO, A. D.; FREITAS, M. O.; BAGGIO FILHO, H. Qualidade ambiental da água superficial do córrego quatro vinténs no município de Diamantina-MG. **Revista Cerrados**, v. 14, n. 1, p. 77-95, 2016.

AZRINA, M. Z.; YAP, C. K.; ISMAIL, A. R.; ISMAIL, A.; TAN, S. G. Anthropogenic impacts on the distribution and biodiversity of benthic macroinvertebrates and water quality of the Langat River, Peninsular Malaysia. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 3, p. 337-347, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.003>

BAGGIO, H.; ARAUJO, A. D.; FREITAS, M. O. Análise dos Parâmetros Físico-químicos Oxigênio Dissolvido, Condutividade Elétrica, Potencial Hidrogeniônico e Temperatura, no Baixo Curso do Rio das Velhas-MG. **Caminhos de Geografia**, v.17, n. 60, p. 105-117, 2016. Doi:10.14393/RCG176008

BAKER, M. E.; KING, R. S. A new method for detecting and interpreting biodiversity and ecological community thresholds. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 25-37, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00007.x>

BARROS, B. T. DA S.; BAGGIO, H.; SILVA, L. F. A.; DIAS, W. P.; COIMBRA, A. O.; VIANA, D. J. S. Avaliação geoquímica da água do córrego Quatro Vinténs no município de Diamantina – MG. **Revista Cerrados**, v. 17, n. 02, p. 145-167, 2019. <https://doi.org/10.22238/rc2448269220191702145167>

BATISTA, M. T. O.; ALMEIDA, M. E.; VANI, G. S.; OLIVEIRA, M. F.; RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K. Enzymes from kidney, gill and brain tissues of *Astyanax bimaculatus* (lambari) as biomarkers of environmental impact in the Una River basin. **Revista Ambiente e Água**, v. 14, n. 7, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2314>

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R.; STORCK, T. R.; CLASEN, B. Potential environmental toxicity of sewage effluent with pharmaceuticals. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 1315-1326, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02264-7>

BISPO, C. A.; LOURENÇO, A. P.; GARRAFFONI, A. R. S. Does tourism impact aquatic insects in a high altitude stream? **EntomoBrasilis**. v. 8, n. 2, p. 96-104, 2015.

BISPO, P. C.; OLIVEIRA, L. G.; BINI, L. M.; SOUSA, K. G. Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera assemblages from riffles in mountain streams of Central Brazil: environmental factors influencing the distribution and abundance of immatures. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2B, p. 611-622, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842006000400005>

BLUME, K. K.; MACEDO, J. C.; MENEGUZZI, A.; SILVA, L. B. D.; QUEVEDO, D. M. D.; RODRIGUES, M. A. S. Water quality assessment of the Sinos River, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1185-1193, 2010.

BRANDIMARTE, A. L.; MELO, A. L. U. Scientometric trends of freshwater benthic invertebrates studies in Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 28, n. 20, 2016. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x4816>

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual prático de análise de água / Fundação Nacional de Saúde**. Brasília: Funasa, 4ª ed., 150 p., 2013.

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS**. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Brasília: Funasa, 1ª ed., 112 p., 2014.

BRAUN, B. M.; PIRES, M. M.; KOTZIAN, C. B.; SPIES, M. R. Diversity and ecological aspects of aquatic insect communities from montane streams in southern Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 2, p. 186-198, 2014. DOI: 10.1590/S2179-975X2014000200009

CALLISTO, M.; FERREIRA, W.; MORENO, P.; GOULART, M. D. C.; PETRUCIO, M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliense**, Sorocaba, v. 14, n. 1, p. 91-98, 2002.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007. <https://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252007000300013>

CAMELO, F. R. B. **Avaliação da qualidade ambiental da Bacia do Rio Uberabinha através de um índice BMWP adaptado**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 61, 2013.

CARDOSO, C. M.; SARTORIO, P. V.; MACHADO, A. S. D.; VIGNARDI, C. P.; ROJAS, D. C. G. C.; PASSOS, M. J. A. C. R.; ROCHA A. J. S.; NGAN P. V.; GOMES, V. Hsp70 and p53 expressions and behavior of juvenile pompano, *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae), at controlled temperature increase. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 470, p. 34-42, 2015). doi:10.1016/j.jembe.2015.04.024

CARDOSO, J.; GIROTTO, S.; SILVA, F.; SCHEIN, V.; LEITE, D. Water quality assessment of an urban stream in Lages, Brazil, through analysis of water physicochemical properties and study of benthic macroinvertebrate communities. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 23, n. 8, p. 10, 2019. doi:<https://doi.org/10.5902/2236117038530>

CARVALHO NETA, R. N.; SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z.; SANTOS, D. M.; TCHAICKA, L. A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. **Aquatic biosystems**, v. 10, n. 12, 2014. <https://doi.org/10.1186/s12999-014-0012-5>

CASATTI, L.; TERESA, F. B.; GONÇALVES-SOUZA, T.; BESSA, E.; MANZOTTI, A. R.; GONÇALVES, C. S.; ZENI, J. O. From forests to cattail: how does the riparian zone influence stream fish? **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 205-214, 2012. doi:10.1590/s1679-62252012000100020

CASTRO, E. R.; VERAS, D. S.; LUSTOSA, G. S.; AZEVÊDO, C. A. S.; JUEN, L. Effects of Environmental Variables and Habitat Integrity on the Structure of the Aquatic Insect Communities of Streams in the Cerrado-Caatinga Ecotone in Northeastern Brazil. **Neotropical Entomology**, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00816-4>

CHEN, N.; WAN, X. L.; HUANG, C. X.; WANG, W. M.; LIU, H.; WANG, H.L. Study on the immune response to recombinant Hsp70 protein from *Megalobrama amblycephala*. **Immunobiology**, v. 219, n. 11, p. 850-858, 2014. doi:10.1016/j.imbio.2014.07.012

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente/IBAMA. **Resolução CONAMA nº 001, de 23 de janeiro de 1986**. 1986. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res0186.html>> Acesso em 19 de abril de 2020.

CORDEIRO, G. G.; GUEDES, N. M.; KISAKA, T. B.; NARDOTO, G. B. Avaliação rápida da integridade ecológica em riachos urbanos na bacia do rio Corumbá no Centro-Oeste do Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, n. 3, p. 702-710, 2016.

CORREDOR-SANTAMARÍA, W.; TORRES-TABARES, A.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Biochemical and histological alterations in *Aequidens metae* (Pisces, Cichlidae) and *Astyanax gr. bimaculatus* (Pisces, Characidae) as indicators of river pollution. **The Science of**

the total environment, v. 692, p. 1234-1241, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.187>

COSTA, D. J. L.; TEIXEIRA, D. Aplicação de Modelo de Autodepuração para Avaliação da Qualidade da Água do Ribeirão do Ouro, Araraquara-SP. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 13, n. 1, p. 49-62, 2010. DOI: 10.25061/2527-2675/ReBraM/2010.v13i1.125.

CRISCI-BISPO, V. L.; BISPO, P. C.; FROEHLICH, C. G. Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera assemblages in two Atlantic rainforest streams, Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 2, p. 312-318, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000200007>

DE LIMA CARDOSO, R.; CARVALHO NETA, R.; DE CASTRO, A.; FERREIRA, C.; SILVA, M.; DE JESUS AZEVEDO, J. W.; SOBRINHO, J.; SANTOS, D. Histological and Genotoxic Biomarkers in *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) for Environmental Assessment in a Protected Area in the Northeast of Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 101, n. 5, p. 570-579, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2464-8>

DE SOUZA, A. R.; MUNIZ, C. C.; OLIVEIRA JUNIOR, E. S. *Eichhornia azurea* como hotspot para macroinvertebrados aquáticos: ferramenta para a aplicação de índices de avaliação ambiental. **Enciclopédia Biosfera**. v. 15, n. 28, p. 1043-1056, 2018. Doi: 10.18677/EnciBio_2018B85

DE SOUZA, F.; TOZZO, R. A. *Poecilia reticulata* Peters 1859 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) como possível bioindicador de ambientes degradados. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 3, n. 2, p. 162-175, 2013.

DEACON, A. E.; RAMNARINE, I. W.; MAGURRAN, A. E. How Reproductive Ecology Contributes to the Spread of a Globally Invasive Fish. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024416>

DEL REY, Z. R.; GRANEK, E. F.; BUCKLEY, B. A. Expression of HSP70 in *Mytilus californianus* following exposure to caffeine. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 855-861, 2011. doi:10.1007/s10646-011-0649-6

DOCILE, T. N.; FIGUEIRÓ, R.; PORTELA, C.; NESSIMIAN, J. L. Macroinvertebrate diversity loss in urban streams from tropical forests. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 237, p. 13, 2016. doi:10.1007/s10661-016-5237-z

DONNENBERG, M. **Escherichia coli: pathotypes and principles of pathogenesis**. San Diego: Elsevier, 2ª ed., 2013.

DUA, V. K.; PANDEY, A. C.; RAI, S.; DASH, A. P. Larvivorous activity of *Poecilia reticulata* against *Culex quinquefasciatus* larvae in a polluted water drain in Hardwar, India. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 4, p. 481-483, 2007. <https://doi.org/10.2987/5560.1>

EKAMBARAM, P.; NARAYANAN, M. Upregulation of HSP70 extends Cytoprotection to fish brain under xenobiotic stress. **Journal of FisheriesSciences.com**, v. 11, n. 1, p. 11-20, 2017.

EKAMBARAM, P.; PARASURAMAN, P.; JAYACHANDRAN, T. Differential regulation of pro-and antiapoptotic proteins in fish adipocytes during hypoxic conditions. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 919-934, 2016. doi: 10.1007/s10695-015-0185-z

EL-SABAAWI, R. W.; FRAUENDORF, T. C.; MARQUES, P. S.; MACKENZIE, R. A.; MANNA, L. R.; MAZZONI, R.; PHILLIP, D. A.; WARBANSKI, M. L.; ZANDONÀ, E. Biodiversity and ecosystem risks arising from using guppies to control mosquitoes. **Biology letters**, v. 12, n.10, 2016. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0590>

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R.; VALPUESTA, J. M. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. **F1000Research**, v. 7, n. 1497, 2018. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15528.1>

FERNANDO, G. K. A. W.; JAYAKODY, S.; WIJENAYAKE, W. M. H. K.; GALAPPATHTHY, G. N. L.; YATAWARA, M.; HARISHCHANDRA, J. A comparison of the larvivorous habits of exotic *Poecilia reticulata* and native *Aplocheilus parvus*. **BMC Ecology**, v. 18, n. 25, 2018. doi:10.1186/s12898-018-0180-1

FITZPATRICK, M. L.; LONG, D. T.; PIJANOWSKI, B. C. Exploring the effects of urban and agricultural land use on surface water chemistry, across a regional watershed, using multivariate statistics. **Applied Geochemistry**, v. 22, p. 1825-1840, 2007.

FRANÇA, C. J.; BERGAMASCHI, R.B. **Mapeamento das áreas periurbanas do Espírito Santo**. Instituto Jones dos Santos Neves, n. 24, 32 p., 2011.

FRANCISCO, C. M.; BERTOLINO, S. M.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, R. J.; MORELLI, S.; PEREIRA, B. B. Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 82, n. 8, p. 514-523, 2019. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1624235>

FREEMAN, P. L.; SCHORR, M. S. Influence of watershed urbanization on fine sediment and macroinvertebrate assemblage characteristics in Tennessee Ridge and Valley Streams. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 19, n. 3, p. 353-362, 2004. <https://doi.org/10.1080/02705060.2004.9664908>

FREITAS, C. E. C.; SOUZA, F. K. S. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia Amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 2, p. 39-45, 2009. <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v1n2200975>

FROEHLICH, C. G. (org.). **Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo**. 2007. Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline>

GARRAFFONI, A. R. S.; PEREIRA, E. S. A visão do poder público com relação aos problemas ambientais e recursos hídricos em Diamantina/MG. **Revista Vozes dos Vales**. Diamantina: UFVJM, Ano 1, n. 01, 2012.

GAULKE, G. L.; DENNIS, C. E. III.; WAHL, D. H.; SUSKI, C. D. Acclimation to a low oxygen environment alters the hematology of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 129-140, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9830-6>

GOLDSCHMIDT, T.; HELSON, J. E.; WILLIAMS, D. D. Ecology of water mite assemblages in Panama – First data on water mites (Acari, Hydrachnidia) as bioindicators in the assessment of biological integrity of neotropical streams. **Limnologia**, 59, 63–77, 2016. doi:10.1016/j.limno.2016.03.007

GOMES, E. P.; PESSOA, F. C. L.; SANTANA, L. R.; CRUZ, J. S. Avaliação da Degradação Hídrica na Bacia Hidrográfica Tocantins Araguaia. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 41, n. 3, p. 503-513, 2018.

GOMES, I. D.; NASCIMENTO, A. A.; SALES, A.; ARAÚJO, F. G. Can fish gill anomalies be used to assess water quality in freshwater neotropical systems? **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 9, p. 5523-5531, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2358-2>

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, n. 1, p. 153-164, 2003.

GURGEL, H. C. B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 1, p. 131-135, 2004

HABERLAND, N. T.; SILVA, F. C. B.; OLIVEIRA FILHO, P. C.; VIDAL, C. M. S.; CAVALLIN, G. S. Análise da influência antrópica na qualidade da água do trecho urbano do Rio das Antas na cidade de Irati, Paraná. **Revista Tecnológica**, v. 21, p. 53-67, 2012.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-332, 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira**. IBGE: Coordenação de população e indicadores sociais, n. 36, 146 p., 2016.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE Cidades: Panorama do Município de Diamantina**. IBGE: Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão, 2020. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/diamantina/panorama>> Acessado em: 28 de julho de 2020.

IEPHA/MG - INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS. **Guia de bens tombados IEPHA/MG**. Belo Horizonte, v. 2, 2ª ed., p. 231-234, 2014.

IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 1, p. 15-19, 2004. doi: 10.1242 / jeb.00707

JACOBSEN, D. Low oxygen pressure as a driving factor for the altitudinal decline in taxon richness of stream macroinvertebrates. **Oecologia**, v. 154, n. 4, p. 795-807, 2008. doi:10.1007/s00442-007-0877-x

JELIHOVSCHI, E. G.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, I. B. ScottKnott: a package for performing the Scott-Knott clustering algorithm in R. **Tendências em Matemática Aplicada e Computacional (São Carlos)**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2014. <https://doi.org/10.5540/tema.2014.015.01.0003>

JUNQUEIRA, M.; ALVES, K.; PAPROCKI, H.; CAMPOS, M.; DE CARVALHO, M.; MOTA, H.; ROLLA, M. Índices bióticos para avaliação de qualidade de água de rios tropicais - síntese do conhecimento e estudo de caso: bacia do alto Rio Doce. **Brazilian Journal of Environmental Sciences**, n. 49, p. 15-33, 2018. <https://doi.org/10.5327/Z2176-947820180322>

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 579-592, 2010.

KARAMOOZIAN, N.; DEHESTANI, M.; BEHJATMANESH-ARDAKANI, R. Investigation of the interaction of hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor, IDF-11774, with heat shock protein, HSP70, using quantum chemistry calculations. **Structural Chemistry**, v. 31, p. 1419-1428, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11224-020-01501-3>

KRUPEK, R. A. Análise comparativa entre duas bacias hidrográficas utilizando um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats. **Ambiência**, v. 6, n. 1, p. 147-157, 2010.

KUSUMAWATHIE, P. H.; WICKREMASINGHE, A. R.; KARUNAWEEERA, N. D.; WIJEYARATNE, M. J. Larvivorous potential of the guppy, *Poecilia reticulata*, in anopheline mosquito control in riverbed pools below the Kotmale dam, Sri Lanka. **Asia-Pacific journal of public health**, v. 20, n. 1, p. 56-63, 2008. <https://doi.org/10.1177/1010539507308507>

LI, W.-H.; LI, Y.-X.; REN, J. High altitude hypoxia on brain ultrastructure of rats and Hsp70 expression changes. **British Journal of Neurosurgery**, v. 33, n. 2, p. 192-195, 2019. doi:10.1080/02688697.2018.1519108

LIU, L.; JOHNSON, H. L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; CIBULSKIS, R.; LI, M.; MATHERS, C.; BLACK, R. E. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2151-2161, 2012.

LUO, K.; HU, X.; HE, Q.; WU, Z.; CHENG, H.; HU, Z.; MAZUMDER, A. Impacts of rapid urbanization on the water quality and macroinvertebrate communities of streams: A case study in Liangjiang New Area, China. **Science of The Total Environment**, v. 621, p. 1601-1614, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.068>

LUZ, L. D.; FERREIRA, M. T. A questão ecológica na gestão dos corpos hídricos - analisando os focos das diretrizes brasileira e europeia. **Revista de Gestão da Água da América Latina**, v.8, n. 1, p.19-31, 2011.

MACÊDO, A. K. S.; DOS SANTOS, K. P. E.; BRIGHENTI, L. S.; WINDMÖLLER, C. C.; BARBOSA, F. A. R.; RIBEIRO, R. I. M. A.; SANTOS H. B.; THOMÉ, R. G. Histological and

molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 735, n. 139505, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>

MALAGI, I.; SAMPAIO, S. C.; PINTO, F. G. S.; ROSA, D. M.; REIS, R. R. Physicochemical quality of and *Escherichia coli* resistance profiles in urban surface waters. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 80, n. 3, p. 661-668, 2020.

MARTINS, R. T.; COUCEIRO, S. R.; MELO, A. S.; MOREIRA, M. P.; HAMADA, N. Effects of urbanization on stream benthic invertebrate communities in Central Amazon. **Ecological Indicators**, v. 73, p. 480-491, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10.013>

MAYER, M. P. & GIERASCH, L. M. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. **The Journal of biological chemistry**, v. 294, n. 6, p. 2085-2097, 2019. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002810>

MENEZES, J. P. C.; OLIVEIRA, L. F. C.; SALLA, M. R. Metrics of benthic communities and habitat quality associated to different types of land use. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, n. 4, p. 737-746, 2019. doi:10.1590/s1413-41522019175589

MEYER, J. L.; PAUL, M. J.; TAULBEE, W. K. Stream ecosystem function in urbanizing landscapes. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 24 n. 3, p. 602-612, 2005.

MOREIRA-DE-SOUSA, C.; DE SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. HSP70 as a biomarker: an excellent tool in environmental contamination analysis-a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 264, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3920-0>

MOREYRA, A. K.; PADOVESI-FONSECA, C. Environmental effects and urban impacts on aquatic macroinvertebrates in a stream of central Brazilian Cerrado. **Sustainable Water Resources Management**, v. 1, n. 2, p. 125-136, 2015. DOI: 10.1007/s40899-015-0013-8.

MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. **Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Technical books Editora, p. 176, 2010.

MURRIETA-MOREY, G. A.; NÁJAR, J.; ALCANTARA-BOCANEGRA, F. Incubación de huevos y determinación del ciclo biológico de *Chironomus* sp. (Chironomidae, Díptera) en cubetas de plástico. **Folia Amazónica**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2016. <https://doi.org/10.24841/fa.v25i1.381>

MUTHUSWAMY, K.; PREMA, D. S.; KRISHNAN, V.; PITCHAIRAJ, G.; SUBRAMANIAM, S. Differential intracellular localization of Hsp70 in the gill and heart tissue of fresh water prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during thermal stress. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 1321-1329, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4291-8>

NASCIMENTO, A. A.; ARAÚJO, F. G.; GOMES, I. D.; MENDES, R. M. M.; SALES, A. Fish Gills Alterations as Potential Biomarkers of Environmental Quality in a Eutrophized Tropical

River in South-Eastern Brazil. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 41, n. 3, p. 209-216, 2012. doi:10.1111/j.1439-0264.2011.01125.x

NASCIMENTO, C. A.; STAGGEMEIER, R.; BIANCHI, E.; RODRIGUES, M. T.; FABRES, R.; SOLIMAN, M. C.; BORTOLUZZI, M.; LUZ, R. B.; HEINZELMANN, L. S.; SANTOS, E. L.; FLECK, J. D.; SPILKI, F. R. Monitoring of metals, organic compounds and coliforms in water catchment points from the Sinos River basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 50-56, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.1613>

NASCIMENTO, E. C. Vale do Jequitinhonha: Entre a carência social e a riqueza cultural. **Revista de Artes e Humanidades**, n. 4, 2009.

NICACIO, G.; JUEN, L. Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: an assessment of the literature. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, n. 5, p. 393-403, 2015. <https://doi.org/10.1111/icad.12123>

NIE, H.; LIU, L.; WANG, H.; HUO, Z.; YAN, X. Stress levels over time in *Ruditapes philippinarum*: the effects of hypoxia and cold stress on hsp70 gene expression. **Aquaculture Reports**, v. 12, p. 1-4, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.08.003>

NIMET, J.; GUIMARÃES, A.; DELARIVA, R. L. Use of Muscular Cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a Biomarker in Biomonitoring of Rural Streams. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 99, n. 2, p. 232-238, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2111-9>

NOZAKI, C. T.; MARCONDES, M. A.; LOPES, F. A.; SANTOS, K. F.; LARIZZATTI, P. S. C. Comportamento temporal do oxigênio dissolvido e pH nos rios e córregos urbanos. **ASA - Atas de Saúde Ambiental**, v. 2, n. 1, p. 29-44, 2014.

NUNES, V. J.; JESUS, T. B. Determinação de metais pesados (Mn, Cd, Cr, Cu, Pb) em peixes das espécies *Astyanax bimaculatus*, *Hoplias malabarcius* e *Oreochromis niloticus* presente na Lagoa Salgada - Rio Subaé - Feira de Santana (Bahia). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 5, n. 1, 2019.

OLIVEIRA A. J.; SANTOS M. C. H. G.; ITAYA N. M.; CALIL R. M. Coliformes Termotolerantes: bioindicadores da qualidade da água destinada ao consumo humano. **Atas de Saúde Ambiental - ASA**, v. 3 n. 2, p. 24-29, 2015.

OLIVEIRA, B. S. S.; CUNHA, A. C. Correlação entre qualidade da água e variabilidade da precipitação no sul do Estado do Amapá. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 2, 2014. doi:10.4136/ambi-agua.1287

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic toxicology**, v. 74, n. 1, p. 53-69, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.04.008>

OMETTO, J. P.; GESSNER, A.; MARTINELLI, L. A.; BERNARDES, M. C.; KRUSCHE, A. W.; CAMARGO, P. B. Macroinvertebrate community as indicator of land-use changes in

tropical watersheds, southern Brasil. **International Journal of Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 4, n. 1, p. 35-47, 2004.

PADOVESI-FONSECA, C.; CORRÊA, A. C. G.; LEITE, G. F. M.; JOVELI, J. C.; COSTA, L. S.; PEREIRA, S. T. Diagnóstico da sub-bacia do ribeirão Mestre d'Armas por meio de dois métodos de avaliação ambiental rápida, Distrito Federal, Brasil Central. **Revista Ambiente & Água**, v. 5, n. 1, p. 43-56, 2010. doi:10.4136/ambiagua.118

PEREIRA, B. B.; CAIXETA, E. S.; FREITAS, P. C.; SANTOS, V. S.; LIMONGI, J. E.; CAMPOS JÚNIOR, E. O.; CAMPOS, C. F.; SOUTO, H. N.; RODRIGUES, T. S.; MORELLI, S. Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivorous fish. **Journal of toxicology and environmental health A**, v. 79, n.12, p. 477-481, 2016. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1176974>

PEREIRA, C. R. **Aquecimento x respostas fisiológicas: mecanismos de estabilidade térmica em *Astyanax brevirostris* (Teleostei, Characidae)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 86 p., 2018.

PEREIRA, D. P.; SANTOS, D. M. S.; CARVALHO NETA, A. V.; CRUZ, C. F.; CARVALHO NETA, R. N. F. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na Laguna da Jansen, São Luís-MA (Brasil). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, 2014.

PEREIRA, L. C. C.; MONTEIRO, M. C.; GUIMARÃES, D. O.; MATOS, J. B.; COSTA, R. M. Seasonal effects of wastewater to the water quality of the Caeté river estuary, Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 467-478, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652010000200022>

PETERSON, M. G.; HUNT, L.; DONLEY MARINEAU, E. E.; RESH, V. H. Long-term studies of seasonal variability enable evaluation of macroinvertebrate response to an acute oil spill in an urban Mediterranean-climate stream. **Hydrobiologia**, v. 797, n. 1, p. 319-333, 2017. doi:10.1007/s10750-017-3194-3

PINTO, M. P. G.; OLIVEIRA, B. O. S.; VALENTE, K. S. Avaliação de Impactos Antropogênicos em córregos na zona urbana da Amazônia Ocidental: Humaitá, Amazonas, Brasil. **Revista brasileira de meio ambiente**, v. 8, n. 3, p. 2-12, 2020. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3874132>

PIRES, M. M.; MULLER, N. F. D.; STENERT, C.; MALTCHIK, L. Influence of different riparian vegetation widths and substrate types on the communities of larval Odonata (Insecta) in southern Brazilian streams. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 32, n. 301, 2020. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x2520>

POLLOCK, M. S., CLARKE, L. M. J., & DUBÉ, M. G. The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. **Environmental Reviews**, v. 15, p. 1-14, 2007. doi:10.1139/a06-006

PORTO, M. F.; PORTO, R. L. L. Gestão de bacias hidrográficas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 43-60, 2008. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142008000200004>

RAMOS, M. A. G.; OLIVEIRA, E. S. B.; PIÃO, A. C. S.; LEITE, D. A. N. O.; ANGELIS, D. F. Water Quality Index (WQI) of Jaguari and Atibaia Rivers in the region of Paulínia, São Paulo, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 5, 2016. doi:10.1007/s10661-016-5261-z

RIBEIRO, L. O.; UIEDA, V. S. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos de um riacho de serra em Itatinga, São Paulo, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 613-618, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752005000300013>

RICHARDS, S.; WITHERS, P. J. A.; PATERSON, E.; MCROBERTS, C. W.; STUTTER, M. Temporal variability in domestic point source discharges and their associated impact on receiving waters. **The Science of the Total Environment**, vol. 571, p. 1275-1283, 2016.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B.; GROS, M.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; BORREGO, C.M.; BARCELÓ, D.; BALCÁZAR, J. L. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, vol. 69, p. 234-242, 2015.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>

SALES, C. F.; SANTOS, K.; RIZZO, E.; RIBEIRO, R.; SANTOS, H.; THOMÉ, R. G. Proliferation, survival and cell death in fish gills remodeling: From injury to recovery. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 68, p. 10-18, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.001>

SANTANA, L.; CAVALCANTE, R. Transformações Metabólicas de Agrotóxicos em Peixes: Uma Revisão. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 257-268, 2016. doi:10.17807/orbital.v8i4.856

SANTOS, D. C.; DA MATTA, S. L.; OLIVEIRA, J. A.; SANTOS, J. A. Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 64, n. 7, p. 861-866, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.03.007>

SANTOS, J. L.; CONCEIÇÃO, A. A.; MACEDO, C. F.; ROCHA, S. S. Biomonitoramento de um riacho na Serra da Jiboia (Bahia, Brasil) por meio de macroinvertebrados bentônicos. **Magistra**, v. 29, n. 2, p. 235-245, 2017.

SANTOS, L. B.; CORREIA, D. L. S.; SANTOS, J. C. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores do impacto urbano. **Journal of Environmental Analysis and Progress**. v. 1, p. 34-42, 2016.

SHAFIQUE, M.; LOPES, S.; DOUM, D.; KEO, V.; SOKHA, L.; SAM, B.; VIBOL, C.; ALEXANDER, N.; BRADLEY, J.; LIVERANI, M.; HIL, J.; RITHEA, L.; ARYAL, S.; HUSTEDT, J. Implementation of guppy fish (*Poecilia reticulata*), and a novel larvicide (Pyriproxyfen) product (Sumilarv 2MR) for dengue control in Cambodia: A qualitative study of acceptability, sustainability and community engagement. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n.11, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007907>

SIEGLOCH, A. E.; SCHMITT, R.; SPIES, M.; PETRUCIO, M.; HERNÁNDEZ, M. I. M. Effects of small changes in riparian forest complexity on aquatic insect bioindicators in Brazilian subtropical streams. **Marine and Freshwater Research**, v. 68, n. 3, p. 519-527, 2016.

SILVA, A. E. P.; ANGELIS, C. F.; MACHADO, L. A. T.; WAICHAMAN, A. V. Influência da precipitação na qualidade da água do Rio Purus. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 733-742, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400017>

SILVEIRA, M. P.; QUEIROZ, J. F.; BOEIRA, R. C. **Protocolo de coleta e preparação de amostras de macroinvertebrados bentônicos em riachos**. Embrapa: Comunicado Técnico, Jaguariúna, v. 19, p. 1-7, 2004.

SIQUEIRA, G. W.; APRILE, F.; MIGUÉIS, A. M. Diagnóstico da qualidade da água do rio Parauapebas (Pará-Brasil). **Acta Amazonica**, v. 42, n. 3, p. 413-422, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672012000300014>.

SOUZA, A. R.; MUNIZ, C. C.; JUNIOR, E. S. O. *Eichhornia azurea* como hotspot para macroinvertebrados aquáticos: ferramenta para a aplicação de índices de avaliação ambiental. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 28, p. 1043-1056, 2018. DOI:10.18677/EnciBio_2018B85.

SOUZA, F. N.; MARIANO, R.; MOREIRA, T.; CAMPIOLO, S. Influence of the landscape in different scales on the EPT community (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera) in an Atlantic Forest region. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08318-x>

SOUZA, Q. S.; MACHADO, C. M. S.; MOURA, L. O. G.; LIMA, F. S. Análise de coliformes totais e termotolerantes-fecais em diferentes pontos da sub-bacia do Rio Poxim-Sergipe, Brasil. **Agroforestalis News**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2017.

STUBBINGTON, R.; PAILLEX, A.; ENGLAND, J.; BARTHÈS, A.; BOUCHEZ, A.; RIMET, F.; SANCHÉZ-MONTOYA, M. M.; WESTWOOD, C. G.; DATRY, T. A comparison of biotic groups as dry-phase indicators of ecological quality in intermittent rivers and ephemeral streams. **Ecological Indicators**, v. 97, p. 165-174. 2019. doi:10.1016/j.ecolind.2018.09.061

THOMAZI, R. D.; KIIFER, W. P.; FERREIRA JR., P. D.; SÁ, F. S. A sucessão ecológica sazonal de macroinvertebrados bentônicos em diferentes tipos de atratores artificiais no rio Bubu, Cariacica, ES. **Natureza on line**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2008.

TOLUSSI, C. E.; GOMES, A.; KUMAR, A.; RIBEIRO, C. S.; LO NOSTRO, F. L.; BAIN, P. A.; DE SOUZA, G. B.; CUÑA, R. D.; HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 926-934, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.056>

TRIPP-VALDEZ, M. A.; BOCK, C.; LANNIG, G.; KOSCHNICK, N.; PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M. Assessment of muscular energy metabolism and heat shock response of the green abalone *Haliotis fulgens* (Gastropoda: Philippi) at extreme temperatures combined with acute hypoxia and hypercapnia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 227, p. 1-11, 2019. doi:10.1016/j.cbpb.2018.08.009

VAN METRE, P. C.; WAITE, I. R.; QI, S.; MAHLER, B.; TERANDO, A.; WIECZOREK, M.; MEADOR, M.; BRADLEY, P.; JOURNEY, C.; SCHMIDT, T.; CARLISLE, D. Projected urban growth in the southeastern USA puts small streams at risk. **PloS ONE**, v. 14, n. 10, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222714>

VIANA, A. M. **Bioindicadores na avaliação da capacidade de autodepuração do Rio Grande, Diamantina - MG**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 72 p., 2018.

VON SPERLING, M. **Estudos e Modelagem da Qualidade da Água de Rios**. Belo Horizonte. UFMG, p. 592, 2007.

WACHTEL, C. C.; DE OLIVEIRA, E. C.; MANIGLIA, T. C.; SMITH-JOHANNSEN, A.; ROQUE, A. A.; GHISI, N. C. Waterborn Genotoxicity in Southern Brazil Using *Astyanax bifasciatus* (Pisces: Teleostei). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 102, n. 1, p. 59-65, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2477-3>

WAITE, I. R.; MUNN, M. D.; MORAN, P. W.; KONRAD, C. P.; NOWELL, L. H.; MEADOR, M. R.; VON METRE P. C.; CARLISLE, D. M. Effects of urban multi-stressors on three stream biotic assemblages. **Science of The Total Environment**, v. 660, p. 1472-1485, 2019. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.240

WARD, N. D.; KEIL, R. G.; MEDEIROS, P. M.; BRITO, D. C.; CUNHA, A. C.; DITTMAR, T.; YAGER P. L.; KRUSCHE A. V.; RICHEY J. E. Degradation of terrestrially derived macromolecules in the Amazon River. **Nature Geoscience**, v. 6, n. 6, p. 1-4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo1817>

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. **Progress on Sanitation and drinking water 2017**. Geneva: WHO Press, 2017. Disponível em: <<https://washdata.org/data/household#!/dashboard/3354>>. Acesso em: 16 de julho de 2020.

YOSHIDA, C. E.; ROLLA, A. P. P. R. Ecological attributes of the benthic community and indices of water quality in urban, rural and preserved environments. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, n. 3, p. 235-243, 2012. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2012005000041>

ZHOU, T.; HU, W.; YU, S. Characterizing interactions of socioeconomic development and environmental impact at a watershed scale. **Environmental science and pollution research international**, v. 26, n. 6, p. 5680-5692, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3875-0>

9. ANEXOS

ANEXO A- Protocolo de Avaliação Rápida da diversidade de Habitats (PARDH).

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO RÁPIDA DA DIVERSIDADE DE HABITATS (PARDH)					
Localização: Ponto		Profundidade:		Largura:	Coletor:
Data de Coleta: / /		Hora da Coleta: :		Clima:	
PARÂMETROS	4 pontos	2 pontos	0 ponto		
1. Tipo de ocupação das margens do corpo d'água (principal atividade)	Vegetação natural	Campo de pastagem/Agricultura/Monocultura/Reflorestamento	Residencial/ Comercial/ Industrial		
2. Erosão próxima e/ou nas margens do rio e assoreamento em seu leito	Ausente	Moderada	Acentuada		
3. Alterações antrópicas	Ausente	Alterações de origem doméstica (esgoto, lixo)	Alterações de origem industrial/urbana (fábricas, canalização, retificação do curso do rio).		
4. Cobertura vegetal no leito	Parcial	Total	Ausente		
5. Odor da água	Nenhum	Esgoto (ovo podre)	óleo/industrial		
6. Oleosidade da água	Ausente	Moderada	Abundante		
7. Transparência da água	Transparente	turva/cor de chá-forte	opaca ou colorida		
8. Odor do sedimento (fundo)	Nenhum	Esgoto (ovo podre)	óleo/industrial		
9. Oleosidade do fundo	Ausente	Moderado	Abundante		
10. Tipo de fundo	Pedras/cascalho	Lama/areia	Cimento/canalizado		
PARÂMETROS	5 pontos	3 pontos	2 pontos	0 ponto	
11. Tipos de fundo	Mais de 50% com habitats diversificados; pedaços de troncos submersos; cascalho ou outros habitats estáveis.	30 a 50% de habitats diversificados; habitats adequados para a manutenção das populações de organismos aquáticos.	10 a 30% de habitats diversificados; disponibilidade de habitats insuficiente; substratos freqüentemente modificados.	Menos que 10% de habitats diversificados; ausência de habitats óbvia; substrato rochoso instável para fixação dos organismos.	
12. Extensão de rápidos	Rápidos e corredeiras bem desenvolvidas; rápidos tão largos quanto o rio e com o comprimento igual ao dobro da largura do rio	Rápidos com a largura igual à do rio, mas com comprimento menor que o dobro da largura do rio.	Trechos rápidos podem estar ausentes; rápidos não tão largos quanto o rio e seu comprimento menor que o dobro da largura do rio	Rápidos ou corredeiras inexistentes.	

(Continua)

PARÂMETROS	5 pontos	3 pontos	2 pontos	0 ponto
13. Freqüência de rápidos	Rápidos relativamente freqüentes; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 5 e 7.	Rápidos não freqüentes; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 7 e 15.	Rápidos ou corredeiras ocasionais; habitats formados pelos contornos do fundo; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 15 e 25.	Geralmente com lâmina d'água "lisa" ou com rápidos rasos; pobreza de habitats; distância entre rápidos dividida pela largura do rio maior que 25.
14. Tipos de substrato	Seixos abundantes (prevalecendo em nascentes).	Seixos abundantes; cascalho comum	Fundo formado predominantemente por cascalho; alguns seixos presentes	Fundo pedregoso; seixos ou lamoso.
15. Deposição de lama	Entre 0 e 25% do fundo coberto por lama	Entre 25 e 50% do fundo coberto por lama.	Entre 50 e 75% do fundo coberto por lama	Mais de 75% do fundo coberto por lama
16. Depósitos sedimentares	Menos de 5% do fundo com deposição de lama; ausência de deposição nos remansos.	Alguma evidência de modificação no fundo, principalmente como aumento de cascalho, areia ou lama; 5 a 30% do fundo afetado; suave deposição nos remansos	Deposição moderada de cascalho novo, areia ou lama nas margens; entre 30 a 50% do fundo afetado; deposição moderada nos remansos	Grandes depósitos de lama, maior desenvolvimento das margens; mais de 50% do fundo modificado; remansos ausentes devido à significativa deposição de sedimentos.
17. Alterações no canal do rio	Canalização (retificação) ou dragagem ausente ou mínima; rio com padrão normal.	Alguma canalização presente, normalmente próximo à construção de pontes; evidência de modificações há mais de 20 anos.	Alguma modificação presente nas duas margens; 40 a 80% do rio modificado.	Margens modificadas; acima de 80% do rio modificado.
18. Características do fluxo das águas	Fluxo relativamente igual em toda a largura do rio; mínima quantidade de substrato exposta.	Lâmina d'água acima de 75% do canal do rio; ou menos de 25% do substrato exposto.	Lâmina d'água entre 25 e 75% do canal do rio, e/ou maior parte do substrato nos "rápidos" exposto.	Lâmina d'água escassa e presente apenas nos remansos.

(Continuação)

PARÂMETROS	5 pontos	3 pontos	2 pontos	0 ponto
19. Presença de mata ciliar	Acima de 90% com vegetação ripária nativa, incluindo árvores, arbustos ou macrófitas; mínima evidência de deflorestamento; todas as plantas atingindo a altura "normal".	Entre 70 e 90% com vegetação ripária nativa; deflorestamento evidente mas não afetando o desenvolvimento da vegetação; maioria das plantas atingindo a altura "normal"	Entre 50 e 70% com vegetação ripária nativa; deflorestamento óbvio; trechos com solo exposto ou vegetação eliminada; menos da metade das plantas atingindo a altura "normal".	Menos de 50% da mata ciliar nativa; deflorestamento muito acentuado.
20. Estabilidade das margens	Margens estáveis; evidência de erosão mínima ou ausente; pequeno potencial para problemas futuros. Menos de 5% da margem afetada.	Moderadamente estáveis; pequenas áreas de erosão freqüentes. Entre 5 e 30% da margem com erosão.	Moderadamente instável; entre 30 e 60% da margem com erosão. Risco elevado de erosão durante enchentes	Instável; muitas áreas com erosão; freqüentes áreas descobertas nas curvas do rio; erosão óbvia entre 60 e 100% da margem.
21. Extensão de mata ciliar	Largura da vegetação ripária maior que 18 m; sem influência de atividades antrópicas (agropecuária, estradas, etc.).	Largura da vegetação ripária entre 12 e 18 m; mínima influência antrópica.	Largura da vegetação ripária entre 6 e 12 m; influência antrópica intensa.	Largura da vegetação ripária menor que 6 m; vegetação restrita ou ausente devido à atividade antrópica.
22. Presença de plantas aquáticas	Pequenas macrófitas aquáticas e/ou musgos distribuídos pelo leito.	Macrófitas aquáticas ou algas filamentosas ou musgos distribuídas no rio, substrato com perifiton.	Algas filamentosas ou macrófitas em poucas pedras ou alguns remansos, perifiton abundante e biofilme.	Ausência de vegetação aquática no leito do rio ou grandes bancos macrófitas (p.ex. aguapé).

(Conclusão)

ANEXO B - Número Mais Provável (NMP) de coliformes em 100ml para combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados em cada diluição (10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL). com limite de confiança de 95%, de acordo com a FUNASA (BRASIL, 2013).

Combinação de positivos	NMP/100 mL	Limites	
		Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	22	12	63
4-2-0	26	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

Combinação de positivos	NMP/100 mL	Limites	
		Inferior	Superior
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	560
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	1600	-	-

ANEXO C - Índices bióticos BMWP e ASPT.

Quadro 1. Escores do índice BMWP (Biological Monitoring Working Party) para macroinvertebrados bentônicos lóticos, adaptado de Junqueira et al. (2018) e Camelo (2013).

Táxon	Escores
Anomalopsychidae, Atriplectididae, Blephariceridae, Calamoceratidae, Euthyplociidae, Griptopterygidae, Hydrosaphidae, Limnephilidae, Limnephilidae, Odontoceridae, Oligoneuriidae, Perlidae, Psephenidae, Spongillidae, Torridincolidae, Xiphocentronidae	10
Aeglidae, Aeshnidae, Calopterygidae, Corduliidae, Ecnomidae, Glossosomatidae, Hyalellidae, Hydrobiosidae, Leptophlebiidae, Lestidae, Perilestidae, Philopotamidae	8
Coenagrionidae, Gomphidae, Helicopsychidae, Hydracarina, Leptoceridae, Leptohyphidae, Libellulidae, Megapodagrionidae, Nematoda, Polycentropodidae, Protoneuridae, Pyralidae	7
Ancylidae, Corydalidae, Dryopidae, Gammaridae, Hydraenidae, Hydrochidae, Hydroptilidae, Hyriidae, Limnichidae, Lutrochidae, Mycetopodidae, Noteridae, Palaemonidae	6
Ampullariidae, Athericidae, Baetidae, Caenidae, Dixidae, Elmidae, Empididae, Hydropsychidae, Limoniidae, Polymitarcyidae, Simuliidae, Tipulidae	5
Ceratopogonidae, Chrysomelidae, Collembola, Corbiculidae, Curculionidae, Dolichopodidae, Dugesidae, Dytiscidae, Gyrinidae, Haliplidae, Hydrophilidae, Lampyridae, Lymnaeidae, Mytilidae, Sciomyzidae, Sialidae, Staphylinidae, Stratiomyidae, Tabanidae, Thiaridae	4
Belostomatidae, Corixidae, Corixidae, Erpobdellidae, Gelastocoridae, Gerridae, Glossiphoniidae, Hebridae, Hydrobiidae, Hydrometridae, Mesoveliidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae, Physidae, Planorbidae, Pleidae, Psychodidae, Sphaeriidae, Veliidae	3
Chironomidae, Culicidae, Ephydriidae, Muscidae	2
Oligochaeta, Syrphidae	1

Quadro 2. Classificação da qualidade da água pelo índice BMWP/ASPT (Biological Monitoring Working Party/Average Score per Taxon) Minas, de acordo com Junqueira et al. (2018).

Classes de qualidade	Índice BMWP/ASPT	Qualidade da água
1	> 6,0	Muito boa
2	5,0 - 6,0	Boa
3	3,9 - 4,9	Regular
4	2,5 - 3,8	Ruim
5	< 2,5	Péssima

ANEXO D - Protocolo de coloração em Hematoxilina e Eosina (H.E.).

Protocolo de Coloração em Hematoxilina e Eosina (H.E.)
Estufa 60°C (2h)
Xilol I (10')
Xilol II (10')
Álcool etílico 100% I (5')
Álcool etílico 100% II (5')
Álcool etílico 95% (5')
Álcool etílico 70% (5')
Água destilada (5')
Hematoxilina férrica (20")
Água corrente (10')
Água destilada I (2")
Água destilada II (2")
Água destilada III (2")
Eosina Amarela (10")
Álcool etílico 100% I (1")
Álcool etílico 100% II (1")
Álcool etílico 100% III (1")
Álcool etílico 95% (2')
Álcool etílico/Xilol 1:1 (2')
Xilol II (2')
Xilol III
Montagem das lâminas

ANEXO E - Protocolo de Imuno-histoquímica (IHQ). Tampão PBS (pH: 7,2 ~ 7,4). Tampão citrato (pH 6,0). Anti-HSP70 concentração 1:500 (PBS).

Protocolo de Imuno-histoquímica	
Dia 1	Dia 2
Xilol I (15')	Rinsagem em tampão PBS
Xilol II (15')	Tampão PBS I sob agitação (5')
Álcool etílico 100% I (5')	Tampão PBS II (5')
Álcool etílico 100% II (5')	Tampão PBS III (5')
Álcool etílico 95% (5')	Secagem com papel filtro
Álcool etílico 70% (5')	Anticorpo Secundário (30')
Água destilada (5')	Rinsagem em PBS
Tampão citrato (temperatura ambiente) (5')	Tampão PBS I sob agitação (5')
Tampão citrato - temperatura 95°C (30')	Tampão PBS II (5')
Água destilada sob agitação (2')	Tampão PBS III (5')
Água destilada (2')	Rinsagem em água destilada
Tampão PBS sob agitação (5')	DAB (2')
Bloqueio da Peroxidase Endógena 3% (4°C - 8°C) (30')	Rinsagem em água destilada
Tampão PBS I sob agitação (5')	DAB (2')
Tampão PBS II (5')	Água destilada sob agitação (5')
Tampão PBS III (5')	Água destilada (5')
Secagem com papel filtro e contorno com caneta histológica no entorno dos tecidos	Hematoxilina (20'')
ProteinBlock (5')	Água corrente (20')
Anticorpo Primário - HSP70 (PBS no controle) (20h)	Álcool etílico 70% (2')
	Álcool etílico 95% (2')
	Álcool etílico 100% I (2')
	Álcool etílico 100% II (2')
	Xilol I (2')
	Xilol II (2')
	Xilol III
	Montagem das lâminas

ANEXO F. Certificado de aprovação do Comitê de Experimentação e Uso de Animais (UFVJM).



MINISTERIO DA EDUCACAO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
COMISSAO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

(Animais de Vida Livre)

Diamantina, 30 de Agosto de 2017.

Certificamos que a proposta intitulada "Bioindicadores de contaminação e autopurificação do Rio Grande - Diamantina- MG", registrada com o nº **030/2017**, sob a responsabilidade de Alex Sander Dias Machado - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em reunião de **16/08/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	14/08/2017 a 14/08/2019
Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO	26291-2
Atividade(s)	<i>Captura e Coleta de espécimes</i>
Espécies/Grupos Taxonômicos	<i>Poecilia reticulata, Astyanax sp.</i>
Local(is) de realização das atividades	Rio Grande, Diamantina, Minas Gerais

O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA/UFVJM durante a vigência do projeto.

Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa 1, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.

Flávio de Castro Magalhães
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM

Campus JK
Comissão de Ética no Uso de Animais - UFVJM
Prédio da Reitoria-PRPPG- Rodovia MG1 367 - Km 583, nº 5000nAlto da Jacuba -
Diamantina MG - CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200

CEUA Comissão de Ética
no Uso de Animais
UFVJM