

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Letícia de Melo Vitorino

**PEIXES, MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS E BACTÉRIAS NO
BIOMONITORAMENTO DE RIO URBANO EM DIAMANTINA - MG, BRASIL**

Diamantina

2021

Leticia de Melo Vitorino

**PEIXES, MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS E BACTÉRIAS NO
BIOMONITORAMENTO DE RIO URBANO EM DIAMANTINA - MG, BRASIL**

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

Orientador: Prof. Alex Sander Dias Machado

Diamantina

2021

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

V845 Vitorino, Leticia de Melo
2021 PEIXES, MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS E BACTÉRIAS NO
BIOMONITORAMENTO DE RIO URBANO EM DIAMANTINA - MG, BRASIL
[manuscrito] / Leticia de Melo Vitorino. -- Diamantina, 2021.
80 p. : il.

Orientador: Prof. Alex Sander Dias Machado .

Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) -- Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal, Diamantina, 2021.

1. Rio urbano. 2. Efluentes domésticos. 3. Bioindicadores.
4. Qualidade ambiental. 5. Peixes. I. Machado , Alex Sander
Dias. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz / CRB6-2886
Técnico em T.I. Thales Francisco Mota Carvalho



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

LETÍCIA DE MELO VITORINO

**PEIXES, MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS E BACTÉRIAS NO
BIOMONITORAMENTO DE RIO URBANO EM DIAMANTINA - MG, BRASIL**

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

Orientador: Prof. Alex Sander Dias Machado

Documento assinado digitalmente
gov.br ALEX SANDER DIAS MACHADO
Data: 30/12/2021 08:28:58-0300
Verifique em <https://verificador.jfj.br>

Data de aprovação 30 /09/2021.

Prof. Dr. Alex Sander Dias Machado
Faculdade de Medicina- UFVJM

Documento assinado digitalmente
gov.br Conceição Aparecida dos Santos
Data: 30/12/2021 11:02:56-0300
Verifique em <https://verificador.jfj.br>

Profa. Dra. Conceição Aparecida dos Santos
Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – UFVJM

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCUS VINÍCIUS POLIGNANO
Data: 30/12/2021 11:05:34-0300
Verifique em <https://verificador.jfj.br>

Prof. Dr. Marcus Vinicius Polignano
Faculdade de Medicina - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e oportunidades que me concedeu ao longo da vida.

Ao meu orientador Alex Sander Dias Machado pela orientação, paciência e pelo seu jeito singular de transmitir conhecimentos.

A minha família por sempre estarem torcendo pelas minhas conquistas e me apoiando nos momentos mais difíceis, em especial a minha mãe Débora Vitorino, por ser exemplo de dedicação e persistência. Ao meu pai Carlos Vitorino por todo apoio e incentivo. A minha irmã Bruna Vitorino pela amizade, companheirismo e pelos conselhos. Ao meu namorado Rodrigo Oliveira por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos de pesquisa Thiago Salgueiro, Paula Munno e Heloísa Aguiar por terem me ensinado tanto, pela ajuda nas coletas e análises laboratoriais e por me incentivarem a persistir mesmo quando as coisas não saíam como o planejado.

Aos colegas de pesquisa Pedro Godoy, Bernardo Monteiro, Emerson e Thamires pela amizade, colaboração nas coletas e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas da turma 2019/02 pelo companheirismo durante a realização das disciplinas.

Aos professores do PPGBA pelo empenho e dedicação ao programa.

Ao Núcleo de Experimentação Animal (NEA) e a técnica Natália de Tartler pelos ensinamentos e ajuda nas análises histológicas do trabalho.

Ao LABESE em nome do Prof. Thiago Santos e a técnica Renata Ursine pelo acolhimento e boa vontade em disponibilizar os materiais necessários para a pesquisa.

Ao Laboratório de Bioprocessos em especial a Profa. Valéria e as técnicas Patrícia e Mércia por auxiliarem nas análises microbiológicas de coliformes.

Ao Laboratório de Microbiologia em nome do Prof. Fulgêncio pela paciência e disponibilidade em colaborar nas análises de antibiograma.

Ao técnico Frank Alison de Carvalho pela amizade e por sempre me incentivar a ser uma profissional mais dedicada.

As minhas amigas Fernanda Vale, Edna Angélica e Isabela Scarlat que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim.

A UFVJM por permitir a realização desse trabalho.

A FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

As águas do Córrego da Prata por propiciar diferentes formas de vida!

RESUMO

A água é um recurso indispensável para a manutenção da vida, porém, os ecossistemas hídricos têm sido afetados pelo desenvolvimento urbano e aumento populacional. Nos cursos d'água brasileiros o maior problema é o despejo de efluentes domésticos sem tratamento. O objetivo do estudo foi avaliar reconhecidos bioindicadores, nos períodos de seca (2019) e chuva (2020), para diagnosticar o estado ecológico do Córrego da Prata, Diamantina - MG. Foram selecionados seis pontos de amostragem do Córrego da Prata (P1 a P6) e um ponto no Córrego Formação (P0), considerado como referencial ecológico. Para avaliação do nível visual de conservação dos trechos foi utilizado um Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats (PARDH). Análises físicas e químicas da água (pH, OD e temperatura) foram medidas utilizando o aparelho Hanna® HI 9828 e os resultados avaliados pelo teste de comparação de médias Scott-Knott. Para as análises de coliformes totais e termotolerantes foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos (NMP). Nos testes de cultura e antibiograma utilizou-se a técnica de difusão de disco. Para classificar a qualidade da água com base nos macroinvertebrados bentônicos foi utilizado o índice Biological Monitoring Working Party/Average Score per Taxon (BMWP/ASPT). Para análises morfofisiológicas foram capturados 6 peixes em cada ponto, sendo as brânquias dissecadas e analisadas na microscopia de luz pela coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para identificar lesões histopatológicas. Para análises de proteômica foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para avaliar a expressão da proteína fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). As pontuações do PARDH diminuíram no sentido à jusante do curso d'água. Foram identificados impactos ambientais evidentes nos pontos urbanos como odor indesejável da água e ausência de mata ciliar. As análises físicas, químicas e microbiológicas da água também demonstraram que a qualidade da água foi inferior nos pontos que sofriam maior interferência humana. Foram identificados 6070 macroinvertebrados bentônicos, as famílias mais abundantes foram Chironomidae (65,83%), Simuliidae (20,15%), Baetidae (5,44%) e Hydroptilidae (2,64%). O índice biótico BMWP/ASPT classificou a água nos pontos P0, P1 e P2 como boa, P3 de regular a boa, P4 regular, P5 de regular a péssima e P6 de regular a ruim. Foram encontradas lesões histopatológicas em peixes do ponto P1, podendo estar associado ao excesso de nutrientes na água, e nos pontos P4, P5 e P6, devido ao lançamento de esgoto doméstico nesses ambientes. Todos os peixes apresentaram expressão da proteína VEGF, porém, elas foram mais evidentes nos pontos mais próximos à foz no córrego da Palha. Os resultados demonstram que tanto as bactérias como os macroinvertebrados bentônicos e peixes foram excelentes bioindicadores evidenciando os impactos negativos

causados pela urbanização e despejo de esgoto no Córrego da Prata, degradando seu estado ecológico, e o fazendo representar risco à saúde humana e animal.

Palavras- chave: Bioindicadores. Qualidade ambiental. Efluente doméstico. Rios urbanos. Peixes. Macroinvertebrados bentônicos. Córrego da Prata – Diamantina MG.

ABSTRACT

Water is an indispensable resource for the maintenance of life; however, water ecosystems have been affected by urban development and population increase. In Brazilian watercourses the biggest problem is the discharge of untreated domestic effluents. The aim of the study was to evaluate the quality of bioindicators, in the dry (2019) and rainy (2020) periods, to diagnose the ecological status of Córrego da Prata, Diamantina - MG. Six sampling points in the Córrego da Prata (P1 to P6) and one point in the Córrego Formation (P0), considered as an ecological reference, were selected. To assess the visual level of conservation of the stretches, a Rapid Habitat Diversity Assessment Protocol (PARDH) was used. Physical and chemical analyzes of water (pH, DO and temperature) were measured using the Hanna® HI 9828 device and the results obtained by the Scott-Knott mean comparison test. For the analysis of total and thermotolerant coliforms for the use of multiple tubes (NMP). In culture and antibiogram testicles a disc diffusion technique is used. To classify water quality based on benthic macroinvertebrates used in the Biological Monitoring Working Group / Average Taxon Score (BMWP / ASPT). For morphophysiological analysis, 6 fish were captured at each point, and the gills were dissected and analyzed under light microscopy using Hematoxylin-Eosin (HE) staining to identify histopathological lesions. For proteomic analysis, the immunohistochemical technique was used to assess the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein. PARDH scores decreased downstream of the watercourse. Clear environmental impacts were identified in urban areas, such as the undesirable odor of water and the absence of riparian vegetation. The physical, chemical and microbiological analyzes of the water also showed that the quality of the water was inferior in the points that suffered greater human interference. A total of 6070 benthic macroinvertebrates were identified, the most abundant families were Chironomidae (65.83%), Simuliidae (20.15%), Baetidae (5.44%) and Hydroptilidae (2.64%). The BMWP/ASPT biotic index classified the water at points P0, P1 and P2 as good, P3 from fair to good, P4 fair, P5 from fair to very bad and P6 from fair to bad. Histopathological lesions were found in fish at point P1, which may be associated with excess

nutrients in the water, and at points P4, P5 and P6, due to the discharge of domestic sewage in these environments. All fish showed expression of VEGF protein, however, they were more evident in points closer to the mouth of the Palha stream. The results demonstrate that both bacteria and benthic macroinvertebrates and fish were excellent bioindicators showing the negative impacts caused by urbanization and sewage disposal in the Córrego da Prata, degrading its ecological status, and making it pose a risk to human and animal health.

Keywords: Bioindicators. Environmental Quality. Domestic effluent. Urban rivers. Fishes. Benthic macroinvertebrates. Córrego da Prata – Diamantina MG.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização dos pontos amostrais do Córrego da Prata e Córrego Formação em Diamantina, MG inseridos na bacia do rio Jequitinhonha.....20
- Figura 2.** Precipitação acumulada mensal (mm) entre os anos 2011 e 2020 do município de Diamantina, MG de acordo com dados pluviométricos registrados pelo INMET. Coleta de chuva (*), coleta de seca (**)21
- Figura 3.** Resultado negativo para coliformes/ausência de bolhas (A); Formação de gás no tubo de Durhan, indicando resultado positivo para coliformes (B).....23
- Figura 4.** Análises microbiológicas de coliformes totais, coliformes termotolerantes e antibiograma realizadas no Córrego da Prata nos períodos de chuva e seca.....24
- Figura 5.** Brânquias de *Astyanax fasciatus* coletados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de chuva e seca. Barra: 1cm.....26
- Figura 6.** Pontos amostrais do Córrego da Prata (P1, P2, P3, P4, P5 e P6) e referencial ecológico (P0) do Córrego Formação em Diamantina-MG.....28
- Figura 7.** Halos de inibição representando a sensibilidade das bactérias aos antibióticos estudados (A); Resultado do teste de antibiograma no ponto P2 no período de seca, representando a resistência de bactérias *E. coli* ao antibiótico Amoxicilina + Clavulanato (B)....31
- Figura 8.** Macroinvertebrados bentônicos mais representativos coletados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de chuva e seca (A) Chironomidae (B) Simuliidae (C) Baetidae (D) Hydroptilidae. Barra: 2mm.....32
- Figura 9.** Ordenação NMDS da comunidade bentônica dos pontos amostrais por condições: natural, periurbano e urbano dos córregos da Prata e Formação nas estações de chuvosa (C) e seca (S).....36
- Figura 10.** Peixes coletados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de chuva e seca. (A) *Astyanax fasciatus*; (B) *Poecilia reticulata* (C) *Geophagus brasiliensis*. Barra: 1cm.37
- Figura 11.** Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax fasciatus*. Coloração Hematoxilina e Eosina. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P0, P1 P2 e P3. Barra 400 µm. Lesão morfológica: fusão parcial dos filamentos (estrela).....37
- Figura 12.** Fotomicrografias de brânquias de *Poecilia reticulata*. Coloração Hematoxilina e Eosina. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P4 P5 e P6. Barra de 400 µm. Lesões morfológicas: aneurisma (cerquilha), fusão total dos filamentos (asterisco), descolamento do epitélio lamelar (seta), fusão parcial dos filamentos (estrela), hipertrofia de células de cloreto (cabeça de seta)38
- Figura 13.** Fotomicrografias de brânquias de *Geophagus brasiliensis* encontrada no P3 no período de chuva. Coloração Hematoxilina e Eosina. (A) Barra de 100 µm (B) Barra de 400 µm.....39

- Figura 14.** Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax fasciatus* Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P0, P1 P2 e P3. Barra de 400 μm40
- Figura 15.** Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax fasciatus*. Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P0, P1 P2 e P3. Barra de 1000 μm41
- Figura 16.** Fotomicrografias de brânquias de *Poecilia reticulata*. Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P4, P5 e P6. Barra de 400 μm42
- Figura 17.** Fotomicrografias de brânquias de *Poecilia reticulata*. Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P4, P5 e P6. Barra de 1000 μm43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Área de zoneamento e coordenadas geográficas dos sete pontos amostrais do Córrego da Prata (P1, P2, P3, P4, P5 e P6) e Córrego Formação (P0) - Diamantina-MG.....21
- Tabela 2.** Pontuação e classificação do Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitat dos pontos amostrais do Córrego da Prata e Córrego Formação em Diamantina-MG, durante períodos de seca e chuva.....29
- Tabela 3.** Médias de ph, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L) dos pontos amostrais, do Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de seca e chuva. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste “Scott-Knott”, em nível de 5%.....30
- Tabela 4.** Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes nos pontos coletados ao longo do Córrego da Prata, Diamantina-MG nos períodos de seca e chuva.....30
- Tabela 5.** Resultado da leitura do halo de inibição do teste de antibiograma nos períodos de seca e chuva (R: Resistente, S: Sensível, I: Intermediário)31
- Tabela 6.** Abundância de macroinvertebrados bentônicos encontrados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de seca (S) e chuva (C)..... 33
- Tabela 7.** Índices bióticos de riqueza e BMWP/ASPT, classificação da qualidade da água segundo BMWP/ASPT, % EPT, % de Chironomidae no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de seca (S) e chuva (C).....35

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ASPT	Average Score per Taxon
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão Cérebro Coração)
BMWP	Biological Monitoring Working Party
CEUA	Conselho de Ética de Uso de Animais
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetra-hidrocarboneto
EBM	Ágar Eosina Azul Metileno
EC	<i>Escherichia coli</i>
EPT	Ephemeroptera, Plecoptera, Thricoptera
IHQ	Imunohistoquímica
HE	Hematoxilina- Eosina
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
NMDS	Escalonamento Dimensional Não-Métrico
NMP	Número Mais Provável
PARDH	Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats
PARs	Protocolo de Avaliação de Rios
PBS	Tampão Fosfato Salino
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
2.2 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Área de Estudo.....	19
3.2 Período de Amostragem	21
3.3 Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats	22
3.4 Análise Físico-química da Água	22
3.5 Análises Microbiológicas da Água.....	22
3.5.1 Coliformes Totais e Termotolerantes.....	22
3.5.2 Antibiograma	23
3.6 Diversidade de Macroinvertebrados Bentônicos	25
3.7 Morfofisiologia de Peixes	25
3.7.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)	26
3.7.2 Imunohistoquímica (IHQ)	27
4. RESULTADOS	27
4.1 Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats	27
4.2 Análise Físico-química da Água	29
4.3 Análise Microbiológica da Água	30
4.3.1 Coliformes Totais e Termotolerantes.....	30
4.3.2 Antibiograma	31
4.4 Diversidade de Macroinvertebrados Bentônicos	32
4.5 Morfofisiologia de Peixes	36
4.5.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)	37
4.5.2 Imunohistoquímica (IHQ)	39
5. DISCUSSÃO	44
5.1 Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats	44
5.2 Análise Físico-química da Água	44
5.3 Análise Microbiológica da Água	46

5.3.1 Coliformes Totais e Termotolerantes	46
5.3.2 Antibiograma	47
5.4 Diversidade de Macroinvertebrados Bentônicos	48
5.5 Morfofisiologia de Peixes	50
5.5.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)	51
5.5.2 Imunohistoquímica (IHQ)	52
6. CONCLUSÃO	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	67

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso indispensável para a manutenção da vida, no entanto, o ecossistema hídrico tem sido afetado devido ao desenvolvimento populacional e ao aumento de residências sem planejamento adequado e estrutura sanitária urbana apropriada (ALVES, ATAIDE, SILVA, 2018). Nos cursos d'água brasileiros, o problema mais relevante é o efluente doméstico, que provoca excesso de matéria orgânica nas águas (JUNQUEIRA, *et al.*, 2018). De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento 16,3% dos brasileiros não possuem acesso à água tratada e cerca de 45,9% da população brasileira não tem acesso a esgotamento sanitário (SNIS, 2019). Em países em desenvolvimento é comum que rios urbanos sofram com a contaminação decorrente de esgoto não tratado, o que traz grandes riscos à saúde dos seres vivos (CUI, *et al.*, 2019).

Nesse sentido, deve-se priorizar a implantação de políticas públicas para gestão eficiente de recursos hídricos, se destacando nesse contexto, os comitês de bacias hidrográficas, previstos pela lei 9.433 que instituí a Política Nacional dos Recursos Hídricos (BRASIL, 1997). Nesses comitês, se reúnem representantes da sociedade civil, poder público e usuários de água com a finalidade de promover o debate das questões relacionadas a recursos hídricos e articular a atuação dessas entidades, considerando os diferentes territórios ao longo da bacia hidrográfica (GARRAFONI & PEREIRA, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2001).

Tendo em vista a problemática atual dos rios e lagos no Brasil, o monitoramento constante e estudo completo da qualidade da água representa um recurso indispensável. A análise da qualidade ambiental deve levar em consideração diferentes tipos de conhecimentos e ferramentas que revelam o estado ecológico de um curso d'água (BOYER, *et al.*, 2019).

Os Protocolos de Avaliação Rápida de Rios (PARs) são instrumentos complementares utilizados no monitoramento de recursos hídricos, e tem como objetivo a avaliação de forma integrada de aspectos que determinam a qualidade dos condicionantes físicos dos rios (GUIMARÃES, RODRIGUES, MALAFAIA, 2012). São ferramentas de fácil utilização e entendimento que auxiliam na análise da estrutura e funcionamento dos

ecossistemas aquáticos contribuindo assim, para o manejo e conservação desses ambientes (CALLISTO, *et al.*, 2002). Os resultados obtidos com os PAR's associados as análises tradicionais de qualidade da água, dão à avaliação um caráter holístico (RODRIGUES & CASTRO, 2008).

As variáveis físicas e químicas também trazem algumas vantagens na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, como a identificação imediata de modificações nas propriedades da água e detecção precisa da variável modificada (GOULART & CALLISTO, 2003). No entanto, quando esses parâmetros são usados isoladamente, não são suficientes para refletir integralmente a qualidade do ambiente aquático. No monitoramento de rios, também são empregados indicadores biológicos específicos, sendo o grupo de coliformes os mais utilizados (SILVEIRA, *et al.*, 2017). A investigação bacteriológica da água desempenha papel importante, visto que permite a avaliação da potabilidade da água e investigação de possíveis surtos de doenças (ALVES, ATAIDE, SILVA, 2018). Estudos microbiológicos da água possuem relevância pois trazem informações para adoção de medidas preventivas e auxiliam nas políticas públicas de saneamento básico (OLIVEIRA, *et al.*, 2020). No ambiente aquático frequentemente são encontradas bactérias potencialmente patogênicas para humanos e animais, sendo que as principais são aquelas pertencentes ao grupo de coliformes, que inclui o gênero *Escherichia* (PONGELUPPE, 2009; BAQUERO, MARTÍNEZ, CANTÓN, 2008).

Os macroinvertebrados bentônicos são organismos amplamente distribuídos que vivem aderidos aos sedimentos do fundo de lagos e rios muito utilizados em programas de biomonitoramento. Eles possuem diversas funções ecológicas, participam da ciclagem de nutrientes e são bioindicadores de qualidade da água (SVENSSON, *et al.*, 2018). As comunidades bentônicas apresentam-se como um método complementar eficaz, pois a integridade desses animais está intimamente relacionada a possíveis alterações no habitat e presença de substâncias poluidoras (SILVA, EVERTON, DE MELO, 2016).

Entre os insetos aquáticos, aqueles pertencentes às ordens Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (EPT) é um grupo importante por apresentarem alta abundância e riqueza de espécies. Esses animais apresentam sensibilidade a poluição, estando presentes em águas limpas com oxigenação elevada (RIGHI-CAVALLARO, SPIES, SIEGLOCH; 2010). Já a família Chironomidae é um grupo de organismos muito amplo e se caracteriza pela alta resistência, podendo habitar diversos ambientes aquáticos, mesmo aqueles que

possuem baixas concentrações de oxigênio dissolvido (CHAGAS, *et al.*, 2017). Os índices bióticos bentônicos e abordagens multimétricas vem recebendo destaque na literatura internacional, sendo essa ferramenta amplamente utilizada em estudos de ecossistemas aquáticos (FERREIRA, PAIVA, CALLISTO, 2009).

O uso de espécies de peixes em estudos de monitoramento ambiental é bastante eficiente, pois são componentes comuns e de fácil amostragem, além disso, podem refletir os distúrbios em diversas escalas por sua posição próxima do topo da cadeia alimentar (FREITAS & SOUZA, 2009). Alterações histopatológicas têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores em estudo de campo com a finalidade de avaliar a saúde de peixes, que refletem as condições de determinados ambientes (CAMARGO & MARTINEZ, 2007). Os organismos aquáticos quando são expostos a poluentes sofrem danos a nível celular e tecidual, podendo causar alterações histológicas e comprometer a função de órgãos (BALULA, 2011).

As brânquias são órgãos muito importantes que desempenham a função de trocas gasosas e osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados residuais, além disso, diversas alterações, a nível molecular resultantes da presença de contaminantes, estão associadas a este órgão (NIMET *et al.*, 2019; BALULA, 2011). O grau de lesões morfológicas nas brânquias pode representar o grau de impacto e poluição ambiental que determinado ambiente se encontra (JABEEN, *et al.*, 2018).

O VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) é em uma glicoproteína que tem a capacidade de promover uma resposta antigênica, aumentando a permeabilidade vascular (GRAÇA, *et al.*, 2004). O processo conhecido como angiogênese é fundamental em determinadas funções fisiológicas. Ele permite a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (VALIATTI, *et al.*, 2011). A ativação do VEGF está intimamente relacionada a estímulos externos tais como hipóxia e baixo pH (GRAÇA, *et al.*, 2004). Dada a importância dessa proteína e suas múltiplas funções fisiológicas, ela tem recebido destaque em estudos da vasculogênese e angiogênese (APTE, CHEN, FERRARA, 2019).

O município de Diamantina está localizado na região do Alto Vale do Jequitinhonha, possui clima temperado úmido, com inverno seco e chuvas no verão. Temperatura média anual de 18,3°C e vegetação de Cerrado e Campo Rupestre (GIANOTTI, *et al.*, 2013).

Diamantina possui córregos e rios importantes em seu território, dentre eles o córrego da Palha/Rio Grande, que percorre os bairros Rio Grande e Palha, e este, se encontra com o Córrego da Prata que abastecem o ribeirão do Inferno, afluente do rio Jequitinhonha (VILAS BOAS, 2013).

Tendo em vista a complexidade da relação entre os moradores do município de Diamantina com esses cursos d'água e dada a importância não só ambiental, mas também histórica e cultural desses rios, sua preservação e conservação deve ser colocada como prioridade pelo poder público municipal e empresa prestadora de abastecimento de água e serviços de esgotamento sanitário. Além disso, um dos fundamentos da Lei 13.199 que dispõe sobre a Política Estadual de Recursos Hídricos é o direito de acesso de todos aos recursos hídricos, sendo prioritários os usos para abastecimento público e manutenção dos ecossistemas. Esse documento também ressalta a participação do poder público, dos usuários e das comunidades na gestão dos recursos hídricos (MINAS GERAIS, 1999).

Atualmente, 80% do efluente doméstico é coletado no município, sendo que desses, 35% recebe tratamento (COPASA, 2019). O objetivo do presente estudo consiste em uma avaliação do estado ecológico do Córrego da Prata, considerando a paisagem do entorno, análises físicas, químicas e microbiológicas da água, avaliação da comunidade bentônica e análises morfológica e molecular da ictiofauna encontrada no córrego em diversos pontos, desde sua nascente até sua foz em período de chuva e de seca.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o estado ecológico do rio Córrego da Prata em estações de chuva e seca utilizando bioindicadores.

2.2 Objetivos específicos

- I) Avaliar as características ecológicas de diversidade de habitats do Córrego da Prata;
- II) Determinar as características físicas, químicas e microbiológicas que refletem a qualidade da água do Córrego da Prata;
- III) Fazer o levantamento da comunidade de macroinvertebrados bentônicos e correlacionar com a qualidade da água e estado ecológicos do rio;
- IV) Verificar a presença ou ausência de peixes nos pontos amostrais e relacionar sua morfofisiologia com a qualidade da água;
- V) Analisar a influência sazonal no estado ecológico do rio comparando estações de seca e chuva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

A área estudada foi o Córrego da Prata, situado na bacia hidrográfica do rio Jequitinhonha, em Diamantina, Minas Gerais. Foram definidos seis (6) pontos de amostragem no Córrego da Prata e um ponto no Córrego Formação, considerando características geográficas do leito (volume, presença de cachoeiras, acessibilidade das margens, presença de afluentes), ocupação humana (presença de casas ou construções) e pontos de despejo de efluentes domésticos (Figura 1).

O rio Jequitinhonha, nasce na Serra do Espinhaço, no município do Serro/MG e abrange os estados de Minas Gerais e Bahia. A ocupação e povoamento dessa bacia foi desencadeada pela procura de ouro e diamante na região (FERREIRA & SAADI, 2013).

Os pontos P1 e P2 estão localizados próximos a duas nascentes do Córrego da Prata, sendo o primeiro localizado na área periurbana do bairro Japão e o segundo na área urbana do bairro Campo Belo, e ambos, são classificados pelo plano diretor do município como Áreas de Preservação (DIAMANTINA, 1999). É importante ressaltar que no ponto P2 existe uma preocupação em relação a pressão imobiliária que pode acarretar poluição hídrica com a construção de novos loteamentos próximos às margens do curso d'água.

O ponto P3 está localizado também no bairro Japão e o ponto P4 está próximo ao condomínio Prata. Apesar da proximidade geográfica entre esses pontos, possuem características físicas bem distintas. Os pontos P5 e P6 localizam-se na área urbana, respectivamente nos bairros Prata e Palha, ambos com uma densidade populacional elevada. O ponto P0, considerado referencial ecológico nesse estudo, é caracterizado por mínima influência antrópica e classificado como Reserva Legal (Tabela 1).

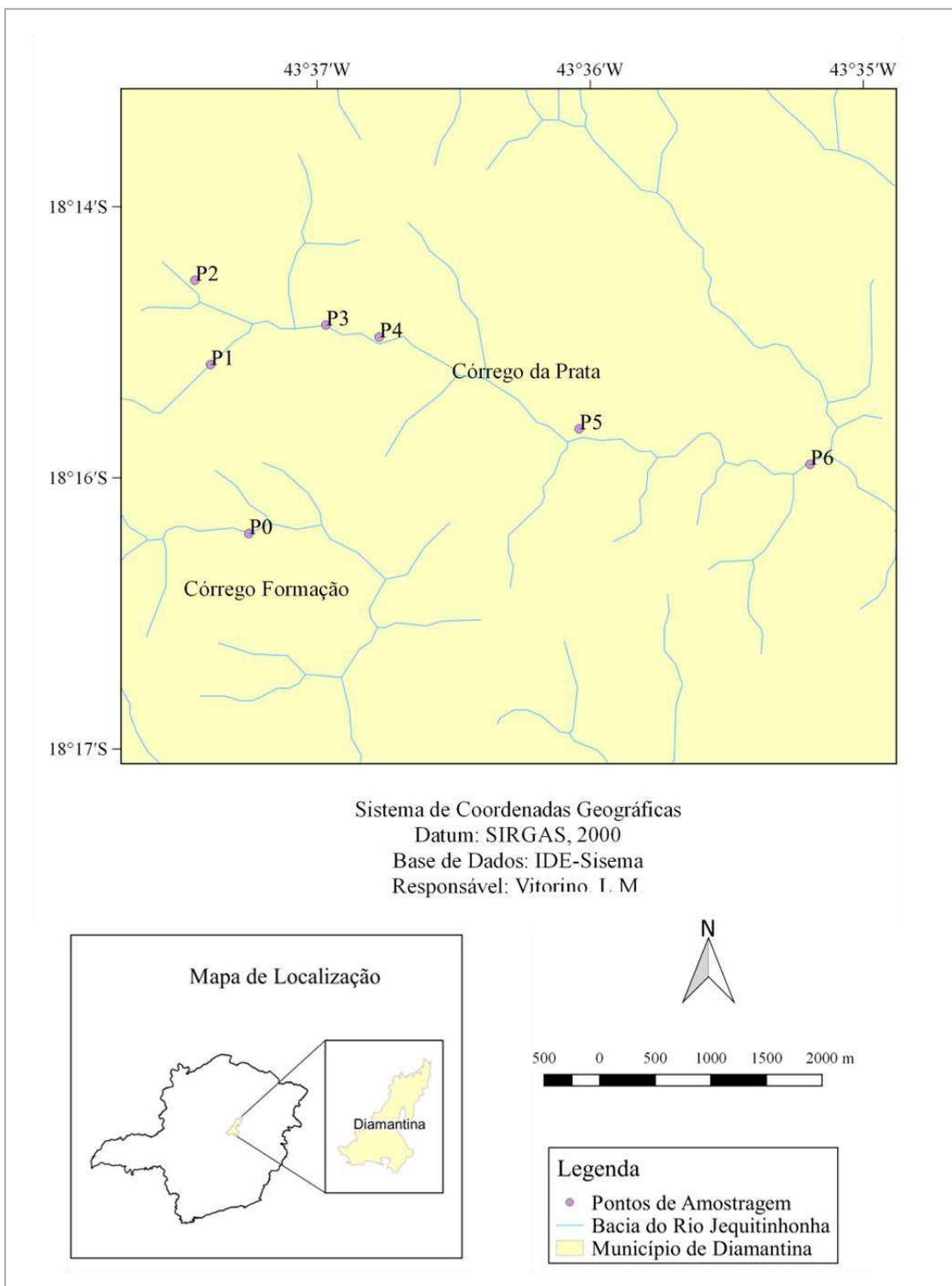


Figura 1. Localização dos pontos amostrais do Córrego da Prata e Córrego Formação em Diamantina, MG inseridos na bacia do rio Jequitinhonha.

Tabela 1. Área de zoneamento e coordenadas geográficas dos sete pontos amostrais do Córrego da Prata (P1, P2, P3, P4, P5 e P6) e Córrego Formação (P0) - Diamantina-MG

Pontos amostrais	Área de Zoneamento	Coordenadas Geográficas	
		Latitude	Longitude
P0	Rural	18,2641° S	43,6250° W
P1	Periurbano	18,2516° S	43,6278° W
P2	Urbano	18,2454° S	43,6289° W
P3	Periurbano	18,2487° S	43,6194° W
P4	Periurbano	18,2496° S	43,6155° W
P5	Urbano	18,2564° S	43,6008° W
P6	Urbano	18,2590° S	43,5839° W

3.2 Período de Amostragem

As coletas foram realizadas em dois momentos, período de seca (setembro de 2019) e período de chuva (fevereiro de 2020) definidos de acordo com os dados do Instituto Nacional de Meteorologia- INMET das médias de precipitações mensais acumuladas de 2010 a 2019 para a região (Figura 2).

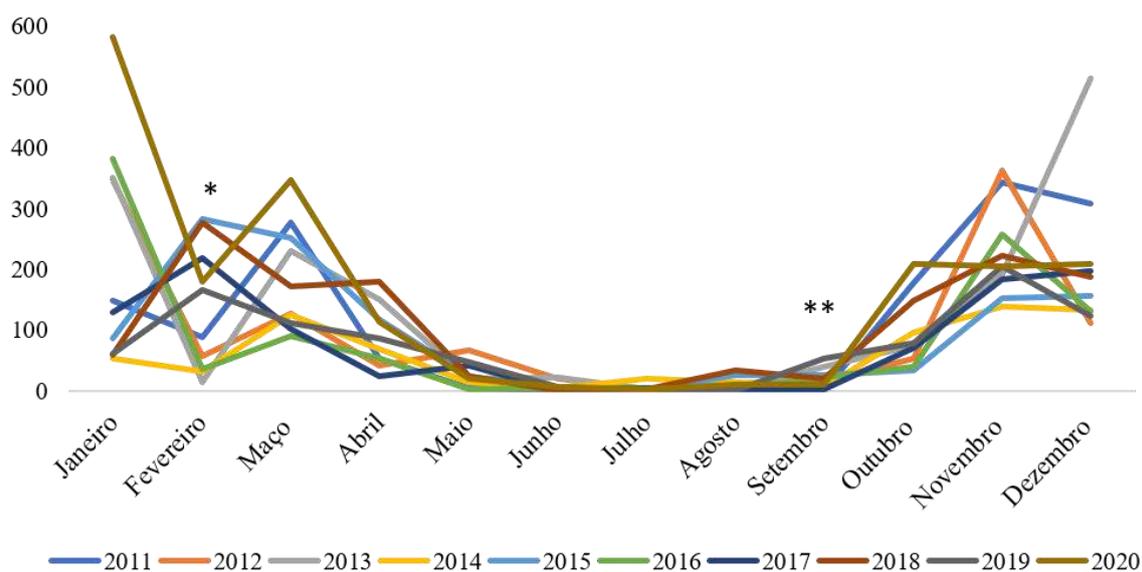


Figura 2. Precipitação acumulada mensal (mm) entre os anos 2011 e 2020 do município de Diamantina, MG de acordo com dados pluviométricos registrados pelo INMET. Coleta de chuva (*), coleta de seca (**).

3.3 Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats

Foi utilizado o Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats (PARDH) elaborado por Callisto, *et al.* (2002) (Anexo A) para avaliar as condições de habitats, níveis de conservação de cursos d'água e da região no entorno. Esse protocolo pontua 22 parâmetros, e classifica os trechos de rios em Impactado - pontuação entre 0 e 40, Alterado - entre 41 e 60 ou Natural - entre 61 e 100.

3.4 Análises Físico-químicas da Água

Os parâmetros físico-químicas foram medidos *in situ*, utilizando o aparelho medidor de parâmetros Hanna® *HI 9828*. Foram feitas três medições em cada ponto, e as variáveis avaliadas foram pH, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L). Para comparação dos resultados entre os pontos amostrados e entre as coletas sazonais, foram realizadas Análise de Variância (ANOVA), seguida de um teste de comparação de médias Scott-Knott, com nível de 5% de significância utilizando o ambiente R (R CORE TEAM, 2018).

3.5 Análises Microbiológicas da Água

As amostras de água foram coletadas nos pontos P2, P4, P5 e P6 em frascos esterilizados e conservadas em caixa térmica contendo gelo. Depois, foram encaminhadas para o laboratório de Bioprocessos no Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, para processamento das análises. Para determinação dos coliformes totais e termotolerantes na água, foi utilizado o método do NMP, técnica do número mais provável ou tubos múltiplos, recomendado pela Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2013).

3.5.1 Coliformes Totais e Termotolerantes

A análise de coliformes totais consistiu em transferir as amostras de água coletada em diferentes diluições (1:1, 1:10 e 1:100) para tubos de ensaio contendo um tubo invertido de Durhan e o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Para cada amostra de água foram utilizados 15 tubos (3 diluições e 5 repetições). Os tubos foram incubados na estufa a 35°C, durante 24-48 horas (Figura 4). Após esse período foi possível identificar o resultado do teste, foram considerados positivos, aqueles que apresentaram formação de gás dentro dos tubos de Durhan.

A partir dos resultados positivos dos testes de coliformes totais, foi realizado o teste de coliformes termotolerantes (Figura 4), utilizando o caldo EC. As amostras inoculadas no teste de coliformes totais foram transferidas para os tubos contendo caldo EC. Em seguida, os tubos foram para o banho maria regulado a 44,5°C por 48 horas. Os tubos que produzirem gás no tundo de Durhan (Figura 3) tiveram seus resultados anotados para posterior verificação na tabela de NMP (ANEXO B).

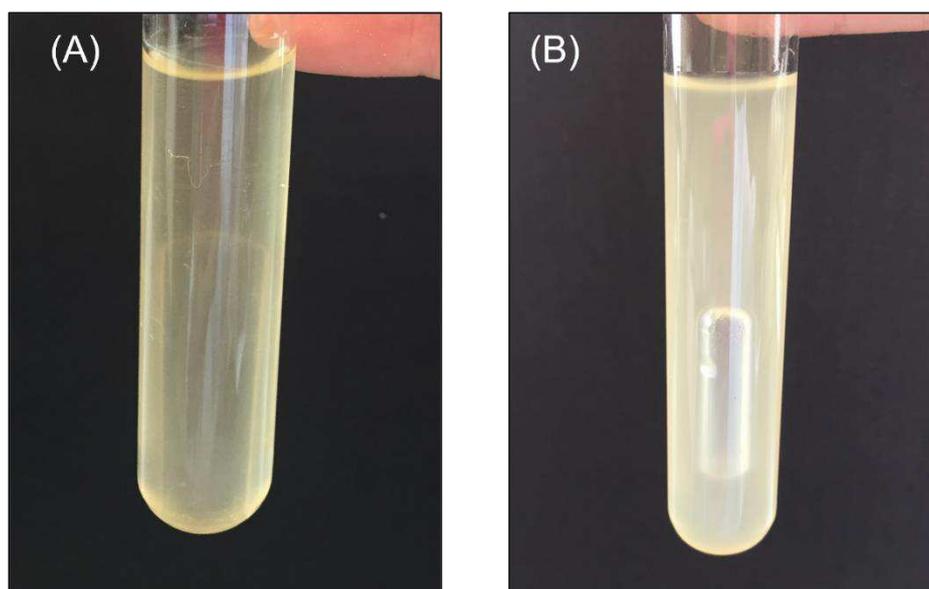


Figura 3. Resultado negativo para coliformes/ausência de bolhas (A); Formação de gás no tubo de Durhan, indicando resultado positivo para coliformes (B).

3.5.2 Antibiograma

Foi utilizada a técnica de difusão de disco de susceptibilidade de Kirby e Bauer (Figura 4), que tem como objetivo determinar a sensibilidade ou resistência de bactérias a determinados antibióticos (TEIXEIRA, FIGUEIREDO, FRANÇA, 2019). No presente estudo, a bactéria analisada foi a *Escherichia coli* (*E. coli*), do tipo gram-negativa, que são encontradas normalmente no intestino de pessoas saudáveis, mas algumas cepas podem causar infecção no trato digestório.

Inicialmente, foi preciso confirmar se a colônia presente era realmente do tipo *E. coli*, para isso, foram transferidas por meio da técnica de esgotamento, as amostras dos testes positivos de coliformes termotolerantes com a alça bacteriológica devidamente flambada e resfriada, para as placas de Petri contendo ágar EMB. As placas foram colocadas na estufa, e a leitura foi feita após 24h. As placas que obtiveram a coloração verde-brilhante

foram consideradas colônias típicas de *E. coli*. A fim de isolar a colônia, foram transferidas as colônias para o ágar BHI com a alça bacteriológica, novamente as placas foram para a estufa e os resultados foram lidos em 24h. Logo, após foi feita a técnica de coloração pelo método gram. As bactérias do tipo gram-negativa, como *E. coli*, apresentaram coloração fucsina após o procedimento. Após a confirmação do gram, as colônias isoladas no ágar BHI, foram transferidas para solução salina (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland. O *swab* estéril foi embebido nessa solução, semeando em seguida de forma suave em todas as direções na placa contendo ágar Muller-Hinton. Com o auxílio da pinça flambada e resfriada, foram colocados os discos de antibiograma. Os antibióticos utilizados foram: Amoxicilina + Clavulanato, Ciprofloxacina, Sulfametoxazol + Trimetoprim. As placas foram incubadas em estufa a 36°C por 24 horas e a leitura foi feita medindo-se o halo inibitório de cada disco com a ajuda de uma régua. Os resultados foram anotados e comparados com a tabela de referência, com o objetivo de determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano testado.

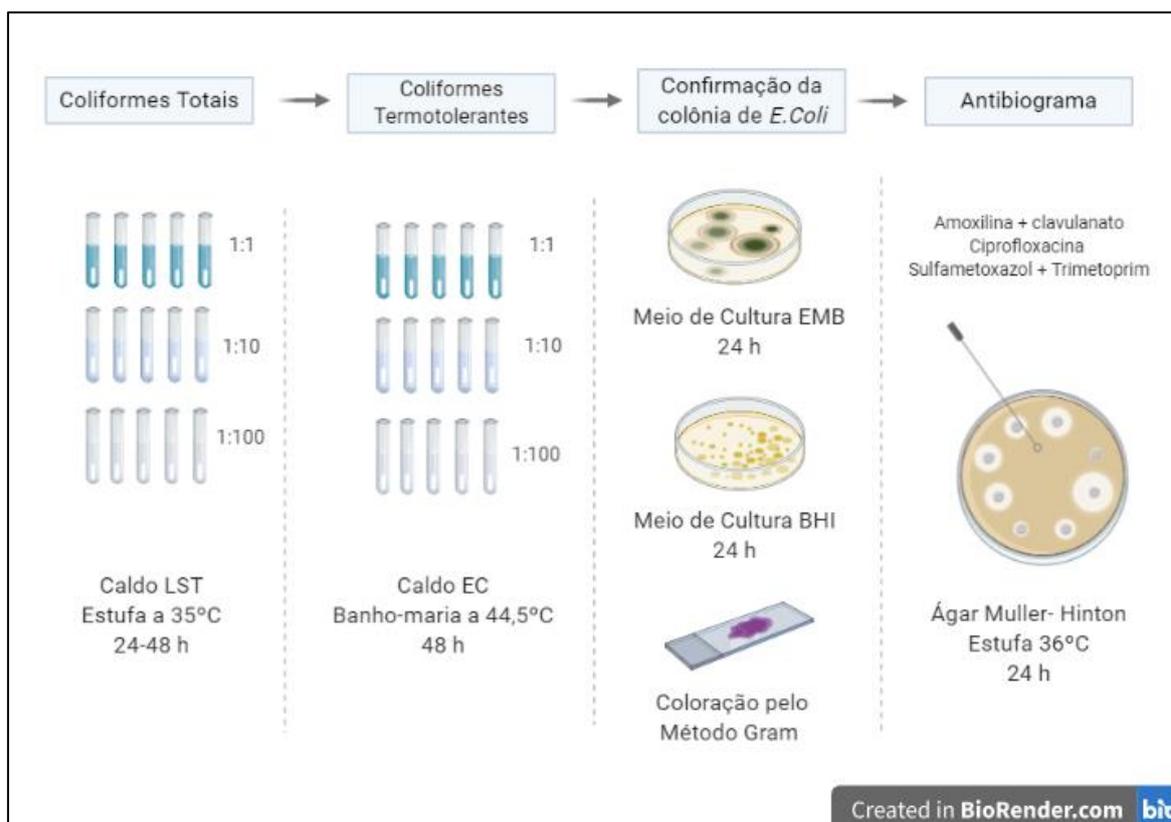


Figura 4. Análises microbiológicas de coliformes totais, coliformes termotolerantes e antibiograma realizadas no Córrego da Prata nos períodos de chuva e seca.

3.6 Diversidade de Macroinvertebrados Bentônicos

Para a coleta dos macroinvertebrados foi utilizado um amostrador tipo Surber, com área útil de 900 cm² e malha coletora de 250 µm. Para cada ponto foram feitas três réplicas. As amostras foram fixadas em formaldeído 4%, etiquetadas e encaminhadas ao laboratório de Ecofisiologia Animal DCBio- UFVJM. O material foi lavado em peneira granulométrica de 100 µm e os indivíduos coletados, foram triados e identificados sempre que possível ao nível taxonômico de família, utilizando literatura específica (MUGNAI, *et al.*, 2010) e microscópio estereoscópio. Após identificação, os indivíduos foram conservados em álcool etílico 80%.

Foram utilizadas as métricas de abundância total, riqueza, %EPT e %Chironomidae para caracterização da comunidade bentônica. Para classificação da qualidade da água nos trechos amostrados, foi utilizado o índice Biological Monitoring Working Party/Average Score per Taxon (BMWP/ASPT) Minas (Junqueira *et al.*, 2018). Esse método consiste em dividir a soma total das pontuações de BMWP pelo número de táxons presentes em cada ponto de amostragem. Para realização desse cálculo, foram utilizadas as pontuações Biological Monitoring Working Party (BMWP) adaptado do BMWP Minas proposto por Junqueira *et al.* (2018), e incluso os scores para os táxons Nematoda e Collembola proposto por Camelo (2013) (ANEXO C).

A análise de ordenação do tipo escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) foi realizada utilizando o software R (R CORE TEAM, 2018) para verificar a distribuição espacial da comunidade bentônica entre os pontos amostrados.

3.7 Morfofisiologia de Peixes

Foram capturados 6 peixes em cada ponto utilizando rede tipo picaré com dimensões de um metro e meio de altura por três metros de largura e malha de 5x5 mm. Após a captura, os animais foram eutanasiados conforme aprovação prévia do parecer pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA)- UFVJM e registro SISBIO. Suas brânquias foram retiradas (Figura 5) e fixadas em Paraformaldeído 4% por 24 horas e transferidas para a solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 onde permaneceram até o processamento. Após a fixação, os tecidos passaram pelo processo de desidratação que consiste na retirada da água do interior da célula, para isso, os tecidos foram imersos em álcool 50% pernoite e passaram por uma série crescente de banhos em álcool (60%,70%,

80%, 90%, 100% I e 100% II) por uma hora em cada concentração. Logo após passaram pelo processo de diafanização, processo pelo qual, torna o tecido translúcido, passando por banhos de xilol I e xilol II por uma hora cada. Na etapa seguinte, denominada inclusão, os tecidos foram embebidos em parafina histológica, inicialmente, permaneceram imersos na estufa a 60° em parafina I overnight, parafina II durante uma hora, e por fim, os blocos foram confeccionados em parafina III. Foram realizados cortes de seções de 5 µm em um micrótomo (ERM 3100) e depositados em lâminas, sendo essas armazenadas até o procedimento de coloração.

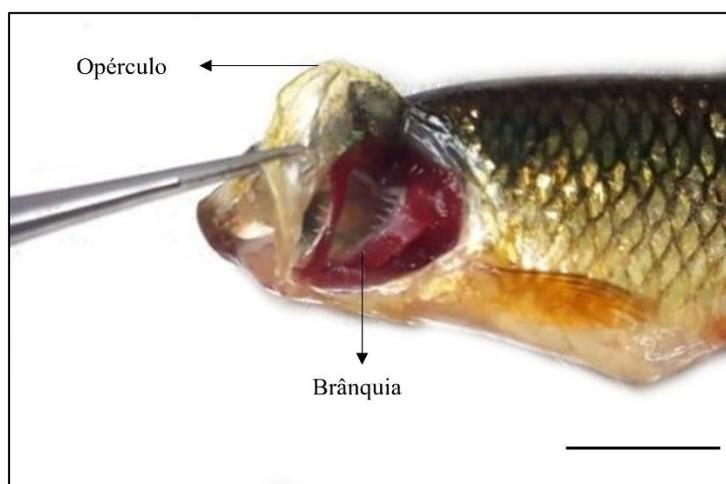


Figura 5. Brânquias de *Astyanax fasciatus* coletados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de chuva e seca. Barra: 1cm.

3.7.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

Foram realizadas coloração de Hematoxilina e Eosina com o objetivo de contrastar as estruturas teciduais e diferenciar o citoplasma do núcleo, fornecendo assim caracterização e identificação morfológicas dos tipos de celulares (ANEXO D). Após a coloração as lâminas foram montadas, os fragmentos foram protegidos pela cobertura com lamínulas de vidro utilizando permount, e após a secagem, as lâminas foram fotomicrografadas em um microscópio (Labomed, LX400p).

3.7.2 Imunohistoquímica (IHQ)

Para realização do procedimento de imunolocalização de proteínas, foi utilizado o anti-VEGF (Novus Bio NB100527) diluído na proporção de 1:1000 em solução de PBS (Tampão fosfato salino). Foram dispostos três cortes em cada lâmina, onde foi aplicado 50 µl de solução PBS em um dos cortes (controle negativo) e nos outros dois, foram aplicados 50 µl do anticorpo anti-VEGF. Durante as etapas descritas detalhadamente no ANEXO E, o anticorpo reage com o VEGF celular e esta reação é amplificada pelo cromógeno DAB (tetra-hidrocarboneto 3,5-diamino-benzidina) e quanto maior for a coloração celular e tecidual marrom-amarelada, maior está sendo a expressão da proteína estudada. Posteriormente, para realizar a contra-coloração do cromógeno, utilizou-se a Hematoxilina. Ao final da realização da IHQ, as lâminas foram montadas e depois da secagem por aproximadamente 72 horas, foram feitas fotomicrografias em microscópio óptico (Labomed LX400p) para observação da expressão do anticorpo no tecido.

4. RESULTADOS

4.1 Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats

A avaliação das condições físicas dos pontos de amostragem, demonstraram que o ponto referencial e os pontos mais próximos das nascentes se encontram mais preservados, já os pontos próximos a foz apresentaram impactos ambientais evidentes como odor indesejável da água, ausência de mata ciliar e instabilidade das margens (Figura 6).



Figura 6. Pontos amostrais do Córrego da Prata (P1, P2, P3, P4, P5 e P6) e referencial ecológico (P0) do Córrego Formação em Diamantina-MG.

As pontuações do Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats (PARDH) variaram de 45 (P6C) a 98 (P0C e P0S). Os pontos P0, P1, P2, P3 e P4 foram classificados como naturais. Os pontos P5 e P6 foram classificados como alterados. A classificação dos pontos foram as mesmas nos períodos de chuva e seca, porém as pontuações foram diferentes (Tabela 2).

Tabela 2. Pontuação e classificação do Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitat dos pontos amostrais do Córrego da Prata e Córrego Formação em Diamantina-MG, durante períodos de seca e chuva

Pontos de Amostragem	Período de Seca		Período de Chuva	
	Pontuação	Classificação	Pontuação	Classificação
P0	98	Natural	98	Natural
P1	96	Natural	97	Natural
P2	90	Natural	96	Natural
P3	84	Natural	74	Natural
P4	68	Natural	68	Natural
P5	53	Alterado	49	Alterado
P6	52	Alterado	45	Alterado

4.2 Análises Físico-químicas da Água

De uma forma geral, os parâmetros físico-químicos avaliados apresentaram diferenças significativas entre os pontos e estações amostradas. O pH da água na época de seca foi ácido (inferior a 7) em todos os pontos. Na época chuvosa, os pontos P0, P1, P2 e P3 também foram classificados como ácidos, já os pontos P4, P5 e P6, nessa mesma época, foram básicos. A temperatura da água na época de chuva foi superior ao período seco em todos os pontos amostrais, exceto no ponto P3. O parâmetro de oxigênio dissolvido apresentou diferença significativa em todos os pontos, com exceção do ponto P1.

Tabela 3. Médias de pH, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L) dos pontos amostrais, do Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de seca e chuva. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste “Scott-Knott”, em nível de 5%.

Pontos Amostrais	pH		Temperatura (°C)		OD (mg/L)	
	Seca	Chuva	Seca	Chuva	Seca	Chuva
P0	5,95 g B	6,96 c A	18,33 h B	24,50 c A	7,26 b A	5,38 c B
P1	5,37 h B	6,16 f A	18,02 h B	25,37 b A	6,88 b A	6,96 b A
P2	6,15 f B	6,82 c A	16,35 j B	20,00 f A	7,38 b B	8,54 a A
P3	6,21 f B	6,78 c A	24,53 c A	22,00 d B	5,85 c B	7,22 b A
P4	6,44 e B	7,82 b A	21,07 e B	26,08 a A	4,69 d B	5,90 c A
P5	6,50 d B	7,95 a A	19,07 g B	25,48 b A	4,37 d B	5,89 c A
P6	6,59 d B	8,00 a A	17,3 i B	21,95 d A	3,54 e B	4,41 d A

4.3 Parâmetros Microbiológicos da Água

4.3.1 Coliformes Totais e Termotolerantes

As análises microbiológicas de coliformes totais e termotolerantes indicaram valores baixos no ponto localizado próximo a nascente (P2), já os outros três pontos amostrais, obtiveram valores máximos (1600 NMP/100 ml) nos dois períodos de coleta.

Tabela 4. Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes nos pontos coletados ao longo do Córrego da Prata, Diamantina-MG nos períodos de seca e chuva.

Pontos amostrais	Coli Totais (NMP/100 mL)		Coli Termotolerantes (NMP/100 mL)	
	Seca	Chuva	Seca	Chuva
P2	300	300	70	240
P4	1600	1600	1600	1600
P5	1600	1600	1600	1600
P6	1600	1600	1600	1600

4.3.2 Antibiograma

Os resultados da análise de antibiograma, evidenciam que as bactérias foram sensíveis aos antibióticos utilizados nesse estudo, com exceção do ponto P2 no período de seca, onde as bactérias *E. coli* demonstraram resistência ao antibiótico amoxicilina+clavulanato (Tabela 5) (Figura 7).

Tabela 5. Resultado da leitura do halo de inibição do teste de antibiograma nos períodos de seca e chuva (R: Resistente, S: Sensível, I: Intermediário).

Antibióticos	P2		P4		P5		P6	
	Seca	Chuva	Seca	Chuva	Seca	Chuva	Seca	Chuva
AMC	R	S	S	S	S	S	S	S
SUT	S	S	S	S	S	S	S	S
CIP	S	S	S	S	S	S	S	S

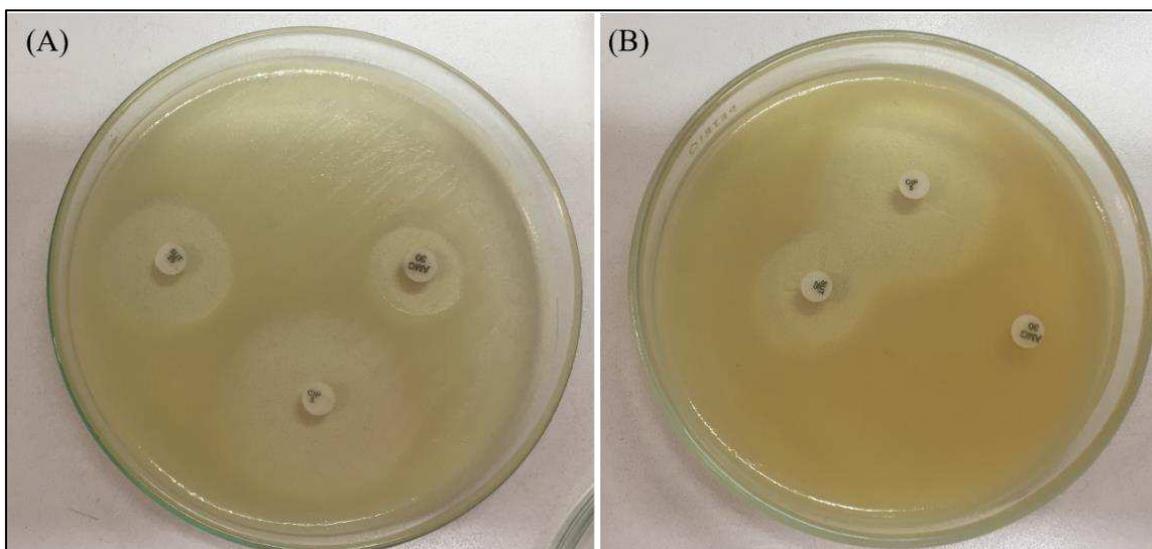


Figura 7. Halos de inibição representando a sensibilidade das bactérias aos antibióticos estudados (A); Resultado do teste de antibiograma no ponto P2 no período de seca, representando a resistência de bactérias *E. coli* ao antibiótico Amoxicilina + Clavulanato (B).

4.4 Diversidade de Macroinvertebrados Bentônicos

Foram identificados 6070 indivíduos de macroinvertebrados bentônicos, sendo esses distribuídos em 33 táxons (Tabela 6). As famílias mais abundantes foram Chironomidae (65,83%), Simuliidae (20,15%), Baetidae (5,44%) e Hydroptilidae (2,64%) (Figura 8).

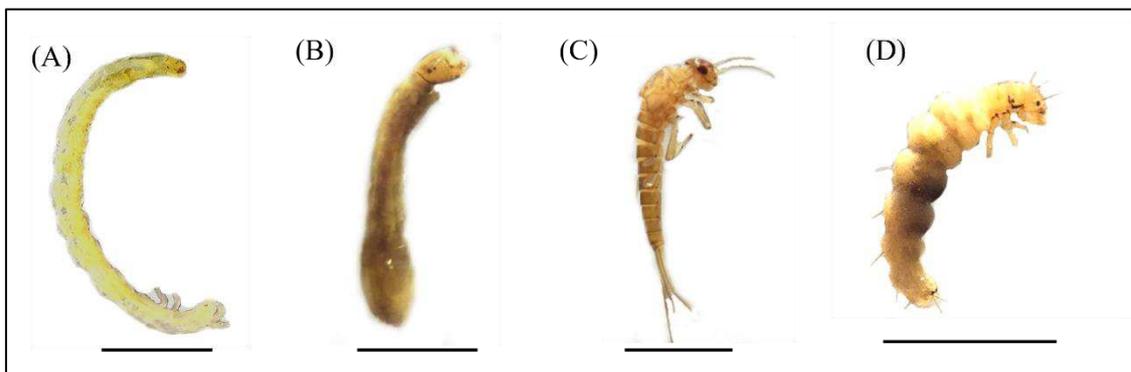


Figura 8. Macroinvertebrados bentônicos mais representativos coletados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de chuva e seca (A) Chironomidae (B) Simuliidae (C) Baetidae (D) Hydroptilidae. Barra: 2mm.

A maior riqueza, ou seja, número de famílias, foi encontrada no ponto referencial (P0) seguida dos pontos à montante (P1 e P2). O índice biótico BMWP/ASPT classificou a qualidade da água no P0, P1 e P2 como boa, P3 de regular a boa, P4 regular, P5 de regular a péssima e P6 de regular a ruim. Foram encontrados espécimes do grupo EPT nos pontos P0, P1, P2 e P3. A porcentagem de Chironomidae foi maior nos pontos urbanos, apesar dessa família estar presente em todos os pontos e períodos de coleta. (Tabela 7).

Tabela 6. Abundância de macroinvertebrados bentônicos encontrados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de seca (S) e chuva (C).

Táxon	Família	P0		P1		P2		P3		P4		P5		P6		Total
		S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C			
Coleoptera	Elmidae	24	17	2	1	1	1				1					47
	Gyrinidae												15			15
	Psephenidae	3	4													7
	Torridincolidae	1			17		7									25
Collembola	-							1	1			1			3	
Diptera	Ceratopogonidae	19					1	1								21
	Chironomidae	691	312	177	94	35	11	263	18	371	324	649	256	397	398	3996
	Culicidae		1							3		4				8
	Empididae	3	3		2	1										9
	Psychodidae		2								2	3			1	8
	Simuliidae	55	48	143	96	13	109	580	123		8		44	1	3	1223
	Stratiomyidae										1				1	2
Ephemeroptera	Baetidae	48	101	158	20				2		1					330
	Leptophlebiidae	8	1													9
Hemiptera	Gerridae	1														1
	Mesoveliidae													1		1
	Vellidae					10										10

(Continua)

Táxon	Família	P0		P1		P2		P3		P4		P5		P6		Total
		S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C			
Hydracarina	-	16	16		1			1							4	38
Lepidoptera	Pyralidae		4		24											28
Mollusca	Physidae									2			10			12
Nematoda	Não identificada							4					1		1	6
Oligochaeta	-	1	7			2		7	6		1	11			9	44
Odonata	Coenagrionidae					5										5
	Calopterygidae					2		2								4
	Libellulidae		2		1			2	1							6
Plecoptera	Gripopterygidae		3	1		1										5
	Perlidae	2	4													6
Trichoptera	Calamoceratidae	4				3										7
	Glossosomatidae					3										3
	Helicopsychidae	4				1										5
	Hydrobiosidae	2	3		2											7
	Hydropsychidae	13	2			3	1									19
	Hydroptilidae	78	73	2	5		1								1	160
	Abundância	973	603	483	263	80	131	860	151	379	336	667	327	409	408	6070

Tabela 7. Índices bióticos de riqueza e BMWP/ASPT, classificação da qualidade da água segundo BMWP/ASPT, % EPT, % de Chironomidae no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de seca (S) e chuva (C).

Índices Bióticos	P0		P1		P2		P3		P4		P5		P6	
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
BMWP	108	103	33	64	73	37	41	24	20	16	8	25	15	24
Riqueza	18	18	6	11	13	7	8	6	6	5	4	6	5	6
BMWP/ASPT	6	5,7	5,5	5,8	5,6	5,3	5,1	4	3,3	3,2	2	4,2	3	4
Classificação BMWP/ASPT	Boa	Regular	Ruim	Ruim	Péssima	Regular	Ruim	Regular						
%EPT	0,16	0,31	0,33	0,1	0,14	0,02	0	0,01	0	0	0	0	0	0
%Chironomidae	0,71	0,52	0,37	0,36	0,44	0,08	0,31	0,12	0,98	0,96	0,97	0,78	0,97	0,98

A ordenação por NMDS permitiu melhor visualização da distribuição espacial das áreas avaliadas. Os pontos P1, P2 e P3 ficaram distribuídos na porção central e na parte esquerda do gráfico. Os demais pontos, se agruparam, situando-se na parte direita do gráfico (Figura 9).

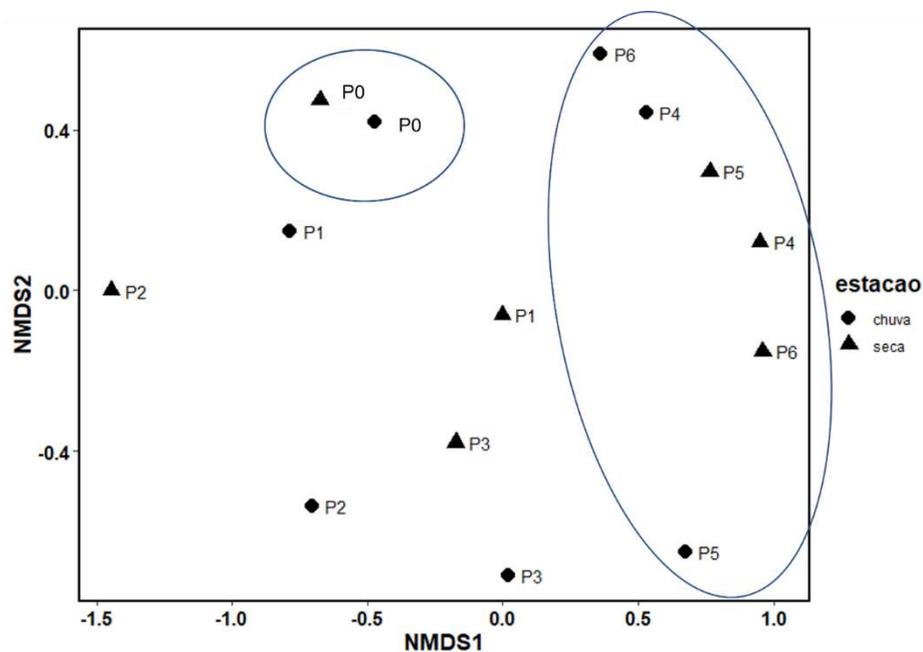


Figura 9. Ordenação NMDS da comunidade bentônica dos pontos amostrais por condições: natural, periurbano e urbano dos córregos da Prata e Formação nas estações de chuvosa (C) e seca (S).

4.5 Morfofisiologia de Peixes

Foram coletados seis peixes em cada ponto amostral, nos dois períodos avaliados. Nos pontos P0, P1, P2 e P3 foram encontrados peixes da espécie *Astyanax fasciatus* Cuvier 1819 (Teleostei; Characidae). Excepcionalmente, no período da chuva foi encontrado também no ponto P3 a espécie *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 (Cichliformes: Cichlidae). Nos pontos P4, P5 e P6 foram constatadas apenas a presença da espécie *Poecilia reticulata* Peters 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) (Figura 10).

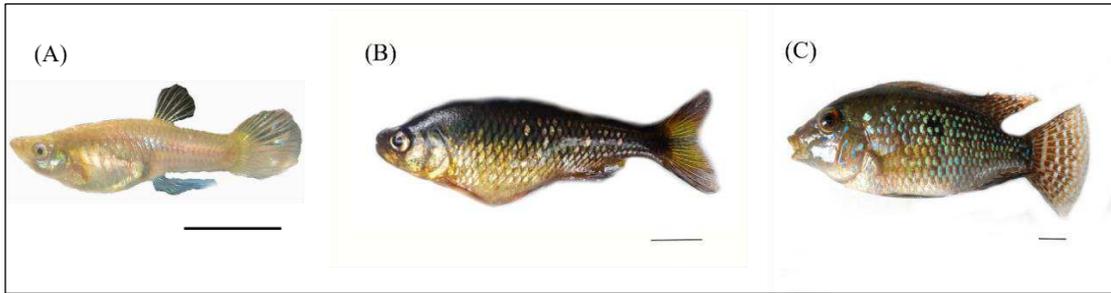


Figura 10. Peixes coletados no Córrego da Prata e Córrego Formação nos períodos de chuva e seca. (A) *Astyanax fasciatus*; (B) *Poecilia reticulata* (C) *Geophagus brasiliensis*. Barra: 1cm.

4.5.1 Coloração Hematoxilina- Eosina (HE)

De acordo com as análises histológicas dos peixes coletados nos diferentes períodos e pontos amostrais, dos peixes da espécie *Astyanax fasciatus*, apenas os pontos P1 chuva e seca apresentaram lesões evidentes. (Figura 11).

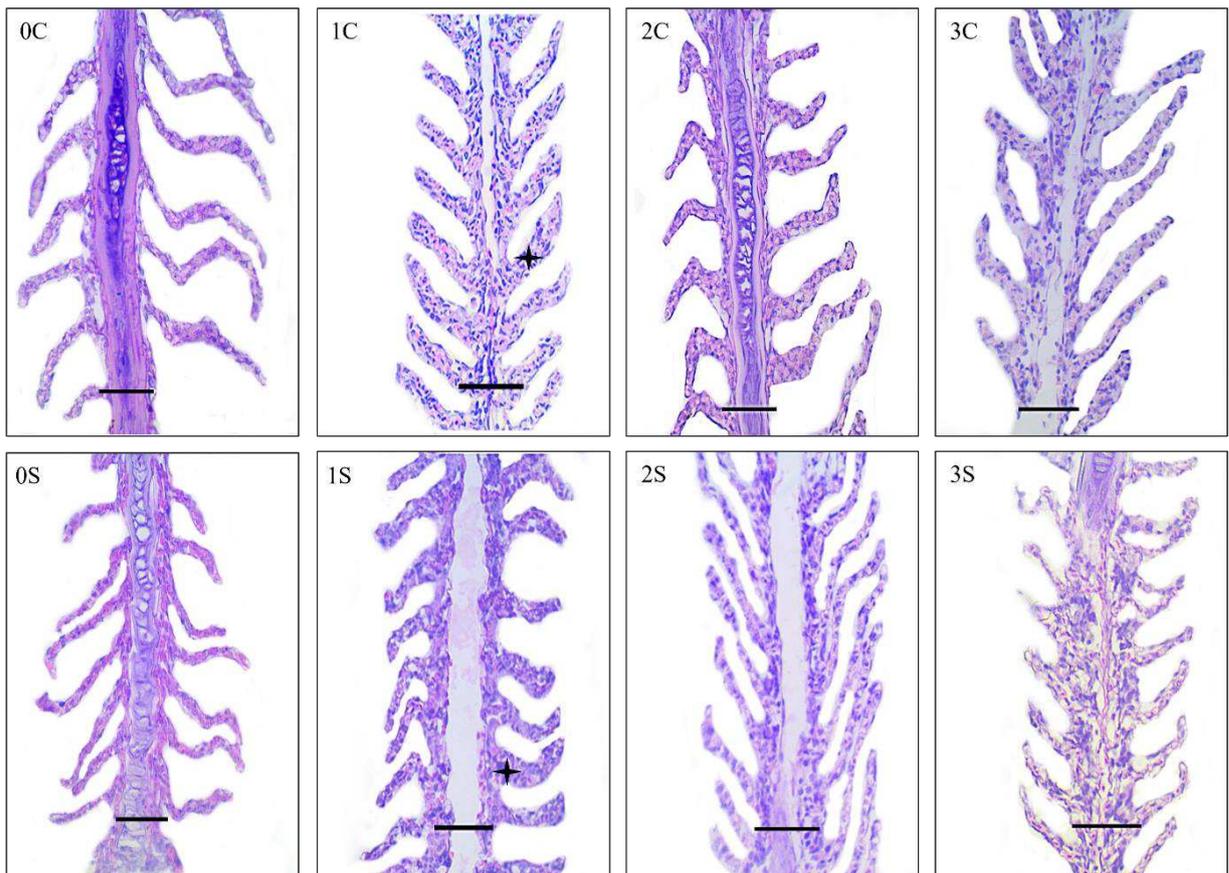


Figura 11. Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax fasciatus*. Coloração Hematoxilina e Eosina. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P0, P1 P2 e P3. Barra 400 μm. Lesão morfológica: fusão parcial dos filamentos (estrela).

Já nos peixes da espécie *Poecilia reticulata*, foram encontradas as seguintes lesões morfológicas: aneurisma, fusão total dos filamentos, descolamento do epitélio lamelar, fusão parcial dos filamentos, hipertrofia de células de cloreto (Figura 12).

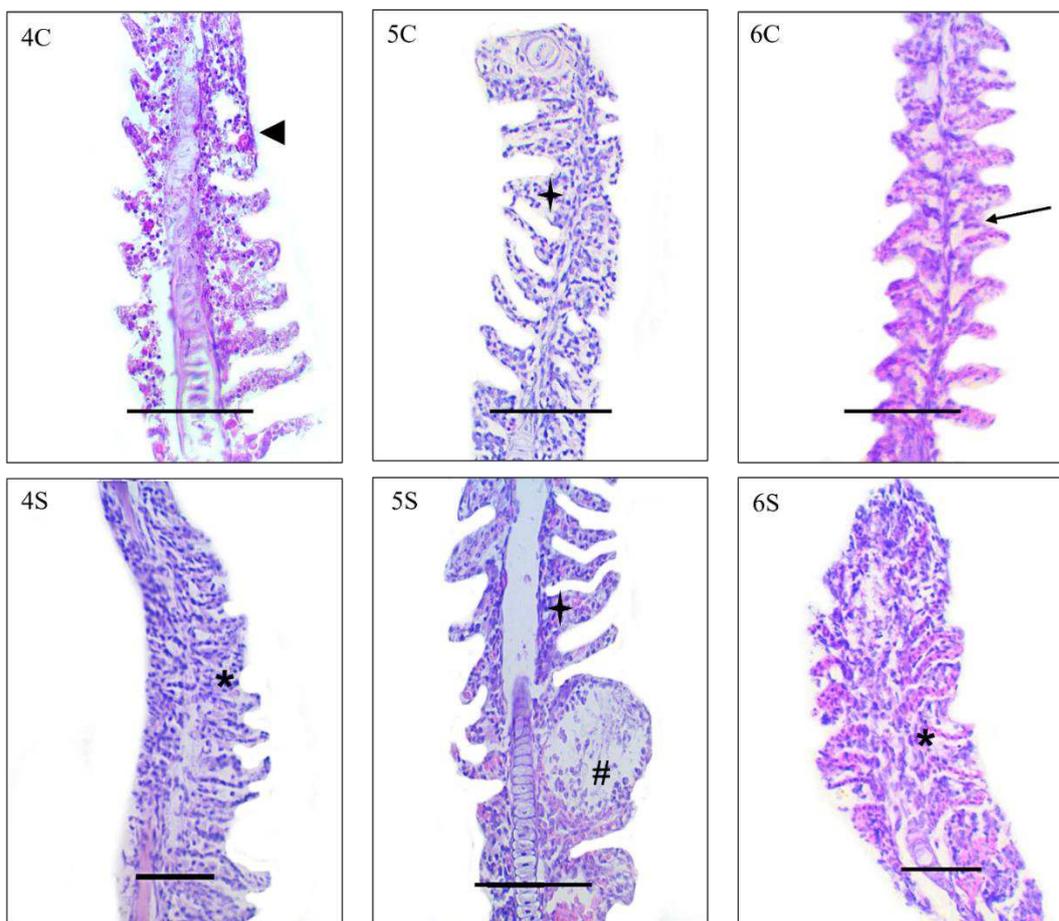


Figura 12. Fotomicrografias de brânquias de *Poecilia reticulata*. Coloração Hematoxilina e Eosina. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P4 P5 e P6. Barra de 400 μ m. Lesões morfológicas: aneurisma (cerquilha), fusão total dos filamentos (asterisco), descolamento do epitélio lamelar (seta), fusão parcial dos filamentos (estrela), hipertrofia de células de cloreto (cabeça de seta).

A espécie *Geophagus brasiliensis* encontrada apenas no P3 no período de chuva não apresentou lesões histopatológicas em suas brânquias (Figura 13).

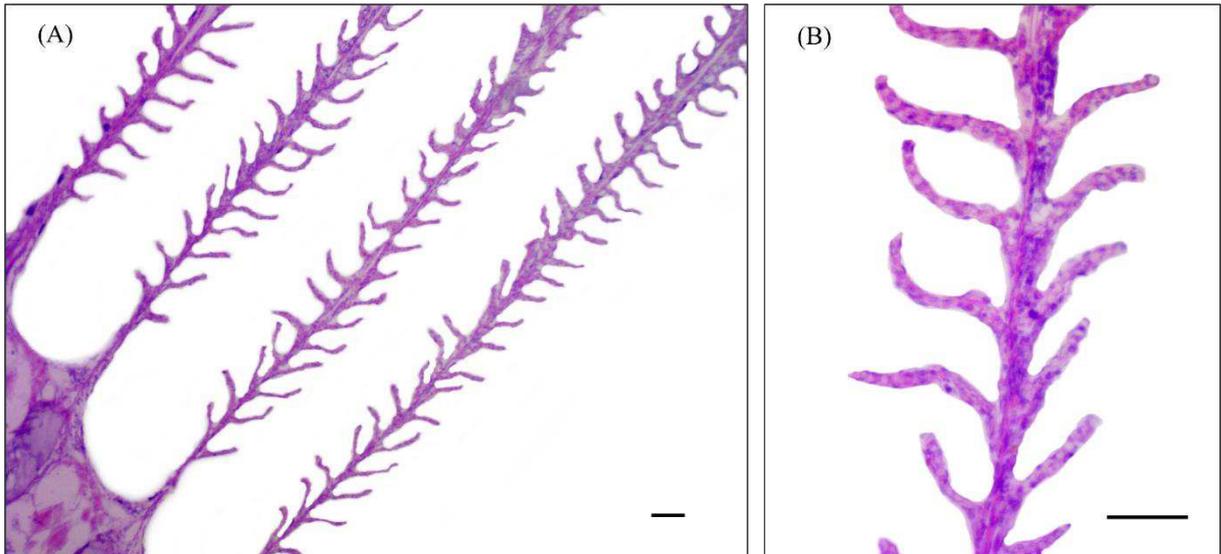


Figura 13. Fotomicrografias de brânquias de *Geophagus brasiliensis* encontrada no P3 no período de chuva. Coloração Hematoxilina e Eosina. (A) Barra de 100 µm (B) Barra de 400 µm.

4.5.2 Imunohistoquímica

A análise de IHQ evidenciou que houve expressão imunohistoquímica da proteína VEGF nas brânquias de *Astyanax fasciatus*. em todos os pontos, tanto na coleta de chuva, quanto na coleta de seca, no entanto, houve variações nessa expressão. O ponto P1 foi o que apresentou maior expressão, principalmente no período chuvoso e o ponto P3 na estação seca (Figura 14) (Figura 15).

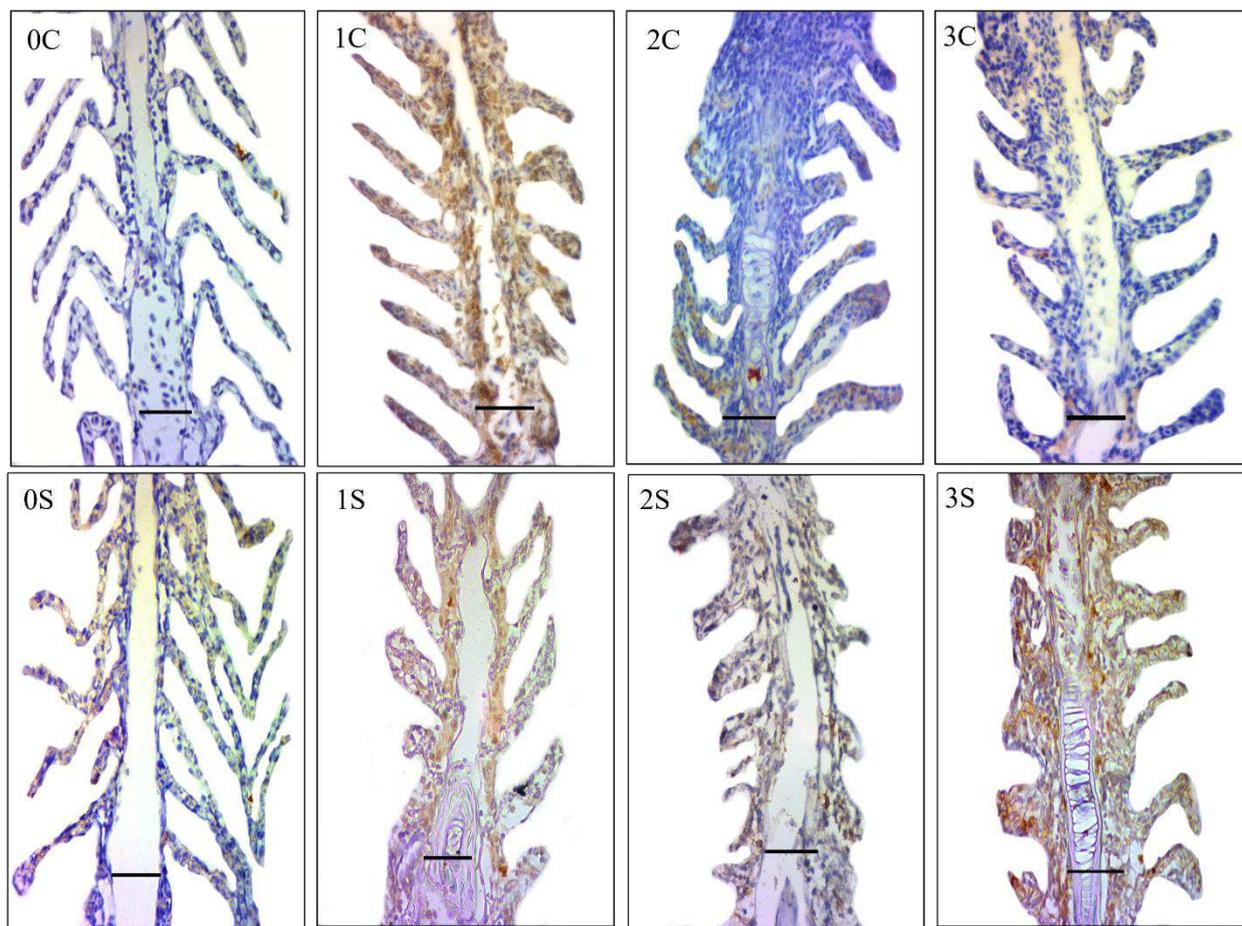


Figura 14. Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax fasciatus* Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P0, P1 P2 e P3. Barra de 400 μ m.

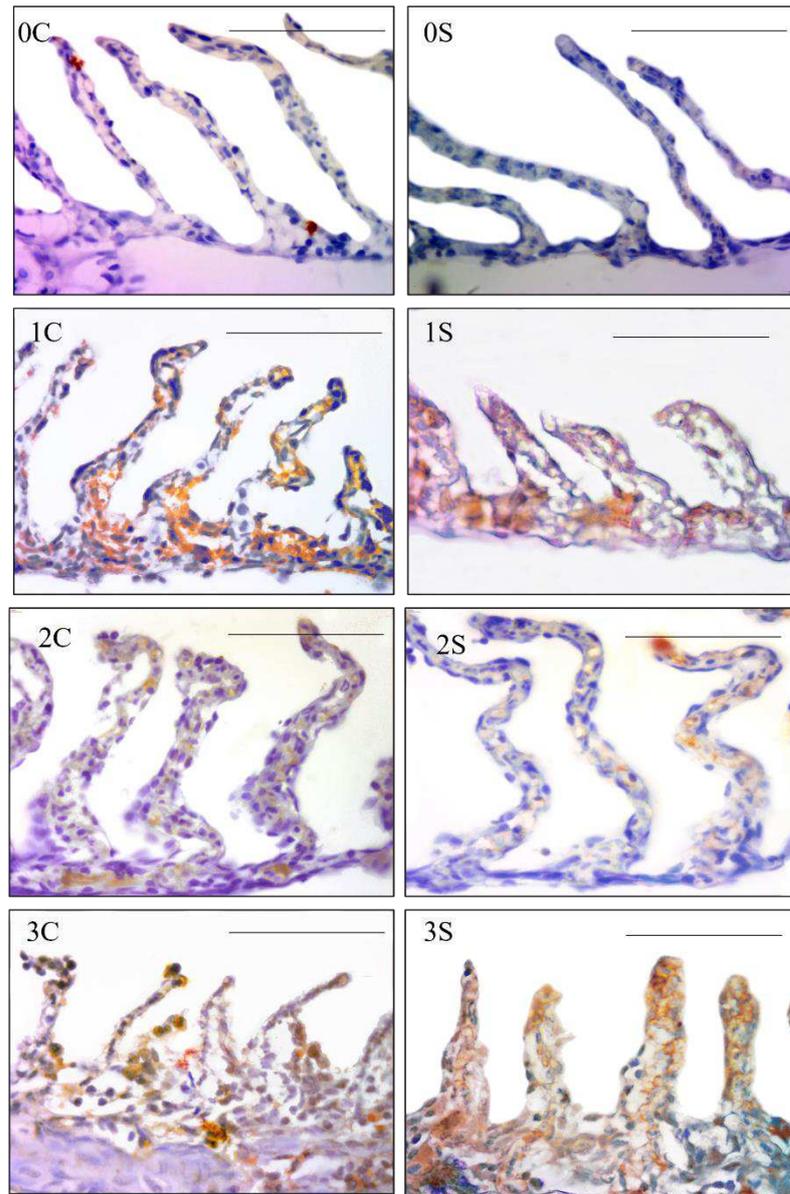


Figura 15. Fotomicrografias de brânquias de *Astyanax fasciatus*. Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P0, P1 P2 e P3. Barra de 1000 μm .

Também houve expressão da proteína estudada nos peixes da espécie *Poecilia reticulata*, constatando que esses animais estão sofrendo uma condição de estresse devido à baixa oxigenação da água. Todos os pontos urbanizados apresentaram expressão da proteína VEGF de forma acentuada (Figura 14) (Figura 15).

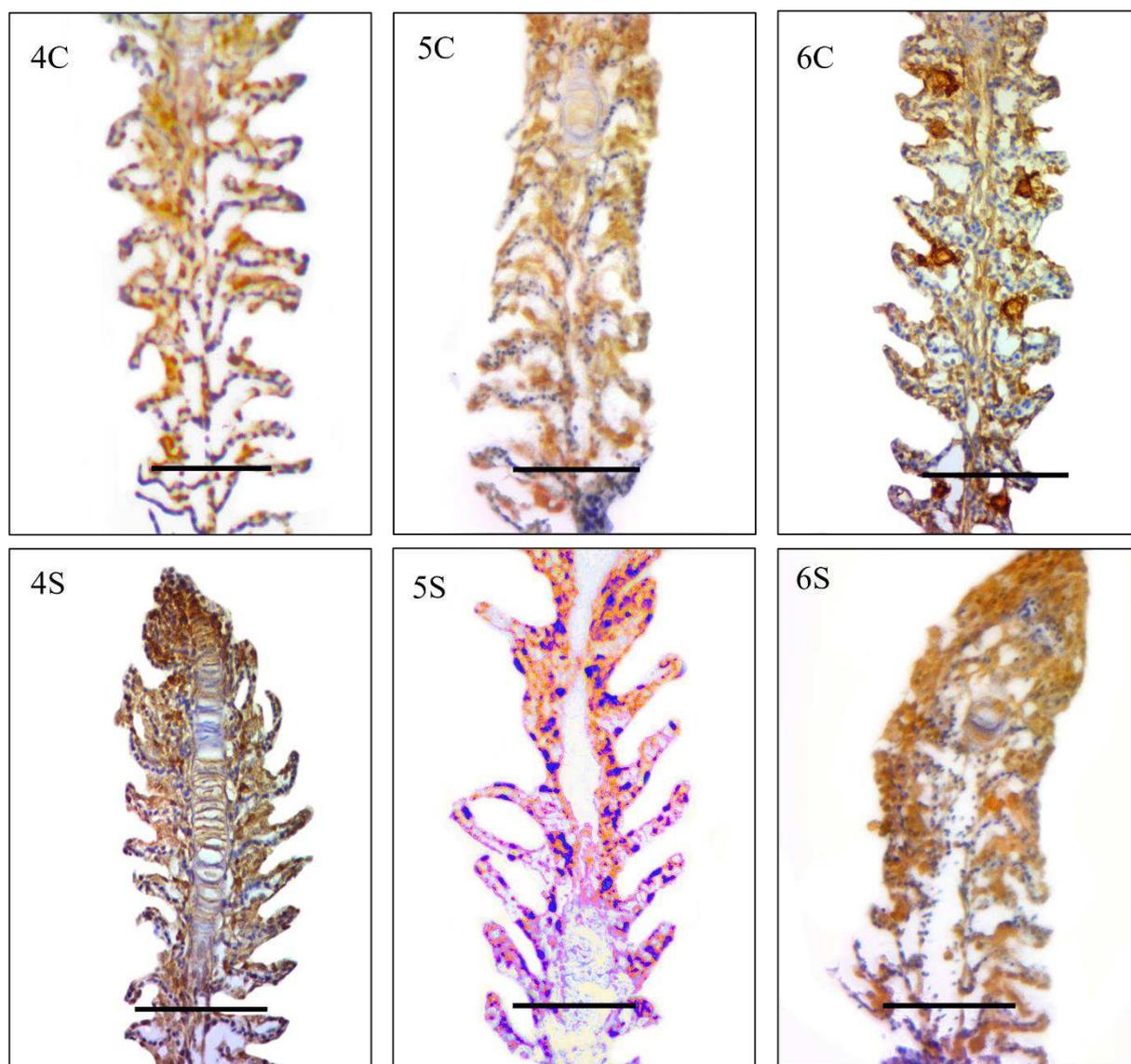


Figura 16. Fotomicrografias de brânquias de *Poecilia reticulata*. Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P4, P5 e P6. Barra de 400 µm.

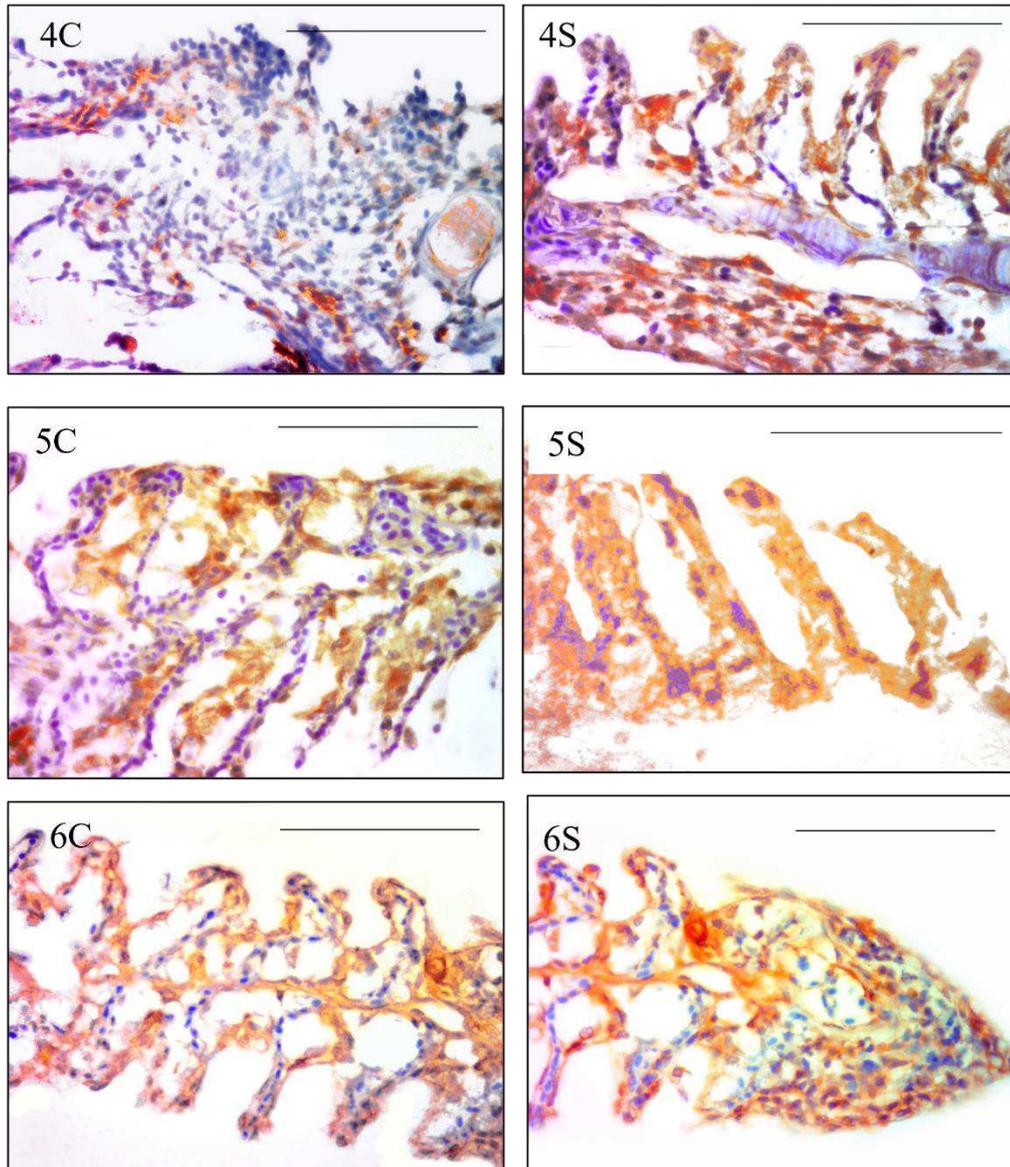


Figura 17. Fotomicrografias de brânquias de *Poecilia reticulata*. Imunohistoquímica- VEGF. Comparação das brânquias no período chuvoso (C) e no período da seca (S) nos pontos de amostragem P4, P5 e P6. Barra de 1000 μm .

5. DISCUSSÃO

5.1 Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats

O resultado do Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats demonstrou que no decorrer dos trechos amostrados houve um decréscimo da qualidade da água, refletindo dessa forma, os impactos negativos gerados pelo processo de urbanização. Os impactos antrópicos decorrentes do uso e ocupação do solo influenciam diretamente para a má qualidade da água (OLIVEIRA & NUNES, 2015).

O Ponto P0, inserido no Córrego Formação possui mínima influência antrópica e características qualitativas muito próximas de ambientes naturais. Os Pontos P1 e P2 localizados próximos a nascentes, caracterizam-se por vegetação no entorno, substrato composto por pedras e cascalhos e estabilidade de margens. O P2 apresentou diferenças sazonais nos scores, pois houve variação na rapidez do fluxo de água, sendo maior no período chuvoso. O ponto P3 também preserva algumas características naturais possui vegetação natural, ausência de odor e oleosidade na água. A pontuação do PARDH no P3 foi menor no período chuvoso, pois foi observado maior instabilidade nas margens. No P4 identificou-se poluição gerada por resíduos sólidos na água e entorno nos dois momentos de coleta. Apesar disso, não havia evidências de erosão e era composto por vegetação natural. Nos pontos P5 e P6 a interferência humana é evidente devido a presença de residências e estradas próximas aos pontos amostrais. A água possui odor forte e oleosidade em função do despejo de esgoto doméstico nesses locais, largura muito pequena de mata ciliar, fundo lamoso e instabilidade nas margens.

Os trechos classificados como “alterados” (P5 e P6) sofrem intensa pressão de atividades antrópicas, como criação extensiva de gado e lançamentos pontuais de esgotos domésticos *in natura* (CALLISTO, *et al.*, 2002). Os esgotos são despejados de forma natural nas valas e nos rios, sendo a água contaminada a principal causa de várias enfermidades. A influência do homem nesse contexto, tem levado a uma expressiva queda da qualidade da água e diminuição da biodiversidade aquática (VASCONCELOS & SOUZA, 2011).

5.2 Análises Físico- químicas da Água

As análises demonstraram que o pH foi maior na chuva em todos os pontos. Piratoba, *et al.* (2017) também chegaram a esse resultado. Todos os pontos na estiagem foram caracterizados como ácidos (<7), assim como os pontos P0, P1, P2 e P3 no período de chuva.

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, o pH deve estar entre 6 e 9 para cursos d'água classe 2, no entanto há exceções, onde a acidificação da água é provocada por influências naturais caracterizados por rios de cores intensas, devido a presença de ácido húmicos resultantes da decomposição de vegetação (FUNASA, 2014). Esses valores baixos de pH encontrados principalmente nos pontos P0 e P1 no período de estiagem, também podem estar associados ao solo de turfeiras encontrados na região, que desempenham importante função ambiental no acúmulo de carbono (SILVA, *et al.*, 2009). Os pontos P4, P5, P6 no período de chuva foram um pouco acima da neutralidade. Em águas destinadas para abastecimento, valores elevados dessa variável podem causar incrustações (SOUSA, *et al.*, 2016).

A temperatura é um parâmetro físico que mede a intensidade de calor. Ela pode ser influenciada por fatores naturais, principalmente energia solar ou antropogênicos, tais como despejos industriais (VON SPERLING, 1996). No estudo esse parâmetro variou 8,18°C na estiagem e 6,08°C no período chuvoso. A legislação brasileira não exige valores mínimos e máximos para a temperatura, no entanto, a Resolução CONAMA 430 de 2011 estabelece 40°C a temperatura máxima para o lançamento de efluentes. Os ambientes aquáticos no Brasil possuem em média temperaturas de 20°C a 30°C (FUNASA, 2014), sendo assim, os resultados encontrados nesse estudo estão próximos ao esperado. A temperatura é uma variável importante de ser medida por influenciar diversas características físicas da água. O aumento desse parâmetro reflete na intensificação da taxa de decomposição da matéria orgânica, aumentando a demanda bioquímica de oxigênio do ambiente aquático, além de intensificar a liberações de nitrogênio e fósforo (BUZELLI & CUNHA-SANTINO, 2013). As atividades fisiológicas dos peixes, como respiração, reprodução e alimentação se relacionam diretamente com a temperatura da água. Cada espécie possui uma determinada temperatura ideal, na qual melhor se desenvolvem. Temperaturas muito elevadas podem levar a mortalidade de peixes (LEIRA, *et al.*, 2017).

O oxigênio dissolvido é considerado um dos parâmetros mais importantes a ser medido por ser um ótimo indicativo de qualidade da água. Esse parâmetro é essencial para organismos aeróbicos sendo sua concentração inversamente proporcional à poluição hídrica (BORTOLOTTI, *et al.*, 2018).

Durante a estabilização da matéria orgânica, as bactérias consomem o oxigênio, podendo acarretar a redução dessa variável no meio aquático, e esse processo pode resultar na mortalidade de peixes (VON SPERLING, 1996). A Resolução CONAMA 357 estabelece que

em cursos d'água classificados como classe 2, o Oxigênio dissolvido (OD) deve ser superior a 5mg/L. Dessa forma, os pontos urbanos P4, P5 e P6 amostrados na estiagem e o ponto P6 na época de chuva não atenderam a essa exigência. Para a sobrevivência de espécies piscícolas, é necessária a concentração mínima de 4mg/L de oxigênio disponível (FUNASA, 2014). Baixas concentrações de oxigênio na água podem acarretar doenças, lesões, redução no crescimento e até mortalidade de peixes (LEIRA, *et al.*, 2017).

5.3 Análises Microbiológicas da Água

5.3.1 Coliformes Totais e Termotolerantes

De acordo com os resultados analisados, houve diferença nos valores de coliformes termotolerantes entre os períodos de chuva e seca no ponto P2, localizado próximo a nascente do Córrego da Prata, sendo que na chuva esse valor foi superior. É conhecida a correlação positiva entre a presença da bactéria *E. coli* e precipitação pluviométrica (OLIVEIRA, *et al.*, 2014, RAMOS *et al.*, 2016). Esses resultados apontam que essa relação pode estar associada ao carreamento de poluentes para o curso d'água durante o período chuvoso.

Os demais pontos amostrados (P4, P5 e P6), obtiveram pontuações máximas de NMP (1600) tanto para coliformes totais, quanto para coliformes termotolerantes em ambos os períodos amostrais.

Acredita-se que as concentrações elevadas de poluentes microbiológicos encontrados nos pontos urbanizados, são provenientes de despejos sanitários não tratados podendo estar associados às condições socioeconômicas da população ao redor, que não tem acesso a esse tipo de serviço. Em estudo realizado no Rio Bacacheri em Curitiba no estado do Paraná, os resultados demonstraram que as populações carentes faziam o despejo diretamente no curso d'água por meio de ligações irregulares por não terem acesso ao tratamento de efluentes (NEVES, *et al.*, 2015). A grande quantidade de resíduos sólidos encontrados no entorno dos pontos amostrados, também podem ter relação com as alta concentração de coliformes encontradas nesses pontos, pois esses resíduos são responsáveis pelo carreamento de matéria orgânica aos cursos d'água (CANTANHÊDE, *et al.* 2014).

As águas destinadas ao abastecimento quando não possuem tratamento, podem conter micro-organismos patogênicos, tornando-se assim um veículo de transmissão de doenças como febre tifoide e paratifoide, disenterias, cólera, diarreia e poliomielite, acometendo

principalmente as crianças, podendo até levar a óbito, por isso, existe a necessidade do monitoramento microbiológico constante de rios (ALVES, ATAIDE, SILVA, 2018; NETO et al., 2012). No município de Diamantina, a empresa responsável pelo serviço de esgotamento sanitário e abastecimento de água é a COPASA, que possui contrato vigente até 2038 (DIAMANTINA, 2008). Nesse sentido, cabe ao poder público municipal a importante tarefa de fiscalizar a execução desses serviços, garantindo a população acesso a água de qualidade.

5.3.2 Antibiograma

As bactérias *E. coli* apresentaram sensibilidade aos antibióticos Amoxicilina + Clavulanato, Ciprofloxacina, Sulfametoxazol + Trimetoprim nos pontos P4, P5 e P6. Já no ponto P2, na estação seca, as bactérias foram resistentes ao antibiótico Amoxicilina + Clavulanato. Essas bactérias podem ter origem em fezes de animais encontradas próximas ao ponto de amostragem. Organismos resistentes a antibióticos entram em cursos d'água através de dejetos, já que essa espécie tem como principal habitat o trato intestinal humano e animal (BAQUERO, MARTÍNEZ, CANTÓN, 2008; SOUZA, et al., 2016).

Os testes de antibiograma têm grande relevância na área das ciências médicas, pois dão subsídios para determinação da terapia antimicrobiana a ser utilizada. Caso a escolha do antibiótico seja inadequada, pode acarretar riscos ao paciente (SEJAS, et al., 2003).

As bactérias são seres com ampla distribuição, ocupando os mais diversos ambientes. Muitas desse grupo são benéficas, no entanto algumas bactérias podem ser causadoras de doenças aos seres humanos. (SANTOS, 2004). A espécie *Escherichia coli*, avaliada nesse estudo faz parte do grupo de coliformes termotolerantes e é considerada indicadora de contaminação fecal recente, e sobrevive pouco tempo no ambiente (PONGELUPPE, et al. 2009, BORTOLOTTI, et al., 2018).

Com a finalidade de impedir a multiplicação de bactérias patogênicas, a sociedade faz uso de antibióticos, no entanto, esses têm sido usados de forma irregular e em quantidades elevadas, ocasionando a resistência de bactérias, fazendo com que os antibióticos não façam mais efeito. Fatores como uso indiscriminado desses fármacos associados as condições precárias de higiene e número de pacientes imunocomprometidos influenciam no aumento da resistência bacteriana (TEIXEIRA, FIGUEIREDO, FRANÇA, 2019).

Assim como a população adquire relativa resistência às doenças, os microrganismos também desenvolvem certa resistência aos antimicrobianos, dessa forma, existe uma

preocupação crescente da humanidade e representa um desafio fazer a utilização correta e de maneira racional dos antibióticos (FRANCO, *et al.*, 2015).

5.4 Diversidade de Macroinvertebrados Bentônicos

Nesse estudo, quatro famílias foram mais representativas (mais de 1%), sendo elas: Chironomidae, Simuliidae, Baetidae e Hydroptilidae. A família Chironomidae, pertencente a ordem díptera, foi a mais abundante, encontrada em todos os pontos amostrados. Nos pontos P4, P5 e P6 esse grupo representou quase 100% do total de indivíduos coletados. Estudos que utilizaram macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores para avaliar a qualidade de rios, também classificaram essa família como a mais numerosa (SVENSSON, 2018; SILVA, EVERTON, DE MELO, 2016; CHAGAS, *et al.*, 2017) Os Quironomídeos são organismos que possuem ampla distribuição geográfica, são os mais encontrados em água doce e indicam teores de matéria orgânica elevados. Sua presença pode estar associada a características como ausência de mata ciliar e lançamento de efluentes sem tratamento (PIEDRAS, *et al.*, 2006). A família Simuliidae, foi a segunda mais abundante no estudo, popularmente conhecidos como “borrachudos”, são encontrados com frequência e ocupam os mais variados ambientes e apresentam importância médica por algumas espécies estarem associados a doenças, como a oncocercose (BERTAZO, K., *et al.*, 2010).

Os indivíduos pertencentes às ordens Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (EPT) foram encontrados em maior número no ponto referencial (P0) e nos pontos à montante (P1 e P2). Esses organismos são considerados sensíveis a poluição, habitualmente vivem em águas límpidas, bem oxigenadas e são considerados indicadores de boa qualidade de água (CHAGAS, *et al.*, 2017). A família Baetidae, terceira mais abundante, é a mais diversa da ordem Ephemeroptera, é mais encontrada em ambientes lóticos, mas também está presente em ambientes lênticos (HAMADA, NESSIMIAN, QUERINO, 2014). A família Hydroptilidae pertencente a ordem Trichoptera, foi a quarta mais abundante, tendo maior representatividade no ponto referencial (P0). As larvas desses insetos são muito pequenas, dificultando sua visualização e são encontradas em uma variedade de substratos como vegetação submersa, raízes rochas e cascalho e tem preferência por ambientes com maior velocidade de fluxo (PESCADOR, *et al.* 2004; MARTINS, 2016).

A abundância e riqueza dos indivíduos variaram entre os pontos e estações, sendo que a riqueza foi maior nos pontos próximos a cabeceira. Nos pontos urbanizados, foi observado

ausência de mata ciliar. A supressão da vegetação provoca a degradação da estrutura física de habitats e conseqüentemente diminui a biodiversidade em ambientes aquáticos (CASTRO *et al.*, 2016). De uma forma geral, essas duas métricas foram maiores na estação seca podendo estar associado a uma maior estabilidade dos fatores ambientais, favorecendo assim, o desenvolvimento dos organismos (THOMAZI, *et al.*, 2008). Em contrapartida, resultados encontrados em outros estudos avaliam que a diversidade maior no período chuvoso ocorre pelo fato dessa estação proporcionar melhores condições de vida (YOBOUÉ, *et al.*, 2020)

O uso de índices de macroinvertebrados já é conhecido e muito utilizado no monitoramento de rios. No entanto, é preciso fazer a adaptação considerando a região em que será implementado (ROCHE, *et al.*, 2010). O índice BMWP/ASPT proposto por Junqueira *et al.* (2018), utilizado nesse estudo, foi adaptado para rios tropicais. Segundo essa métrica, os pontos: referencial (P0), P1 e P2 tiveram uma classificação boa, tanto no período chuvoso, quanto no período seco. O ponto P3 teve melhor classificação na estação chuvosa do que na seca, sendo elas boa e regular, respectivamente. As águas nos demais pontos (P4, P5, P6) foram classificadas de regular a péssima, sendo as ordens de macroinvertebrados bentônicos mais encontradas aquelas denominadas tolerantes ou resistentes a poluição hídrica.

Pela análise espacial NMDS, observou-se que o ponto referencial (P0) apresentou maior proximidade com os pontos próximos a cabeceira (P1 e P2). Em estudo realizado no córrego da Palha, localizado no mesmo município do presente estudo, observou-se dois agrupamentos, um entre os pontos à montante, e outro entre os pontos à jusante (SALGUEIRO, 2020). Além disso, também foi verificado que quanto mais urbanizado o ponto de amostragem, mais distante ele ficou do ponto de referência (P0). O tipo de substrato, velocidade da água e presença de vegetação ripária, são alguns dos fatores físicos que podem influenciar nas comunidades bentônicas. Além disso, a emissão de esgoto doméstico, que ocorre nos pontos P4, P5 e P6, é bastante prejudicial para a biota aquática, pois reduz a quantidade de oxigênio na água comprometendo a vida de organismos mais sensíveis (FERREIRA & CASATTI, 2006; BATISTA, *et al.*, 2010).

5.5 Morfofisiologia de Peixes

A comunidade de peixes inclui espécies muito diversas, sendo umas mais tolerantes e outras mais sensíveis as alterações físicas e químicas da água, resultantes de fontes poluidoras (FREITAS & SOUSA, 2009). Os peixes são considerados bons bioindicadores pelo fato de estarem próximo ao topo da cadeia alimentar, possuem relação direta com os organismos de cadeia inferior, além disso, sobrevivem em diferentes tipos de habitats (LINS, *et al.*, 2010).

Nos pontos P0, P1, P2 e P3 foram capturados peixes da espécie *Astyanax fasciatus*, popularmente conhecidos como lambaris de cauda vermelha, que segundo Pompeu, Alves, Callisto (2005) são peixes típicos de cabeceira. Essa espécie é muito utilizada em testes toxicológicos e ambientais devido a sua ampla distribuição geográfica e sua sensibilidade a poluentes (TOLUSSI, *et al.*, 2018).

Excepcionalmente, no ponto P3 no período chuvoso, foi detectada a presença da espécie *Geophagus brasiliensis*, conhecido como “cará” vivem geralmente no fundo de águas paradas, são solitários e apresentam alimentação bem diversa como matéria orgânica, vegetais e invertebrados bentônicos (DE MORAES, BARBOLA, DUBOC, 2004; ROCHA, *et al.*, 2015). A espécie *G. brasiliensis* tem sua importância em estudos de bioindicadores, principalmente em ambientes impactados com metais pesados (DORIA, VOIGT, DE CAMPOS, RAND, 2017).

Nos pontos urbanos P4, P5 e P6, foi detectada apenas a presença da espécie *Poecilia reticulata* que é uma espécie que possui baixa exigência, se alimenta de detritos e pode sobreviver em ambientes alterados (VIEIRA & SHIBATTA, 2007). Essa espécie está associada a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, consequente da presença de resíduos industriais ou domésticos na água. Essa condição, proporciona a colonização do ambiente por esses indivíduos, que por ausência de competição ou predação, aumentam sua taxa reprodutiva (GOMIERO & BRAGA, 2007; SOUZA & TOZZO, 2013). Peixes do gênero *Poecilia*, também conhecidos popularmente como Guppy, são modelos utilizados em estudos ecotoxicológicos por serem bioindicadores de poluentes, além do manejo ser fácil e barato (ANTUNES, *et al.*, 2017).

5.5.1 Coloração Hematoxilina Eosina (HE)

As brânquias são órgãos muito sensíveis, e quando são expostas a ambientes poluídos, apresentam alterações histopatológicas consequente da situação de estresse sofrida. Elas são formadas principalmente por filamentos primários, filamentos secundários, células epiteliais, mucosas, pilares e de cloreto. Nesse sentido, a histologia é uma técnica muito utilizada para avaliar efeitos tóxicos em tecidos de animais (LINS, *et al.*, 2010).

Nos peixes da espécie *Astyanax fasciatus*, só foram encontradas alterações evidentes no ponto P1, nos períodos de chuva e seca que apresentaram uma leve fusão parcial dos filamentos. Esse resultado pode estar associado ao uso de fertilizantes em plantações de uva encontradas próximas ao ponto de coleta. Esses fertilizantes provocam altas concentrações de nutrientes na água, estando associadas à presença de cianobactérias, que são organismos capazes de produzir substância tóxica aos seres vivos, chamadas cianotoxinas (FERRÃO-FILHO, MOLICA, AZEVEDO, 2009). É importante que se faça o controle de nutrientes na área da bacia hidrográfica, que por meio de escoamento superficial chegam até os cursos d'água (CHIA & KWAGHE, 2015). As principais causas da eutrofização, ou seja, concentrações elevadas de nutrientes em ambientes aquáticos, são o lançamento de esgotos sanitários e uso de fertilizantes na agricultura (PANTANO, *et al.*, 2016).

No peixe da espécie *Geophagus brasiliensis* não foram encontradas lesões histopatológicas, possivelmente por ter sido encontrado no ponto P3, que está próximo a nascentes do Córrego da Prata.

Nos peixes da espécie *Poecilia reticulata* foram encontradas lesões histopatológicas em todos os pontos e períodos amostrados. Essas alterações nas brânquias estão associadas a uma resposta fisiológica adaptativas dos animais, que estão submetidos a ambientes de baixa qualidade (PEREIRA, *et al.*, 2014). O descolamento do epitélio lamelar é uma lesão frequentemente encontrada em estudos (LUPI, *et al.*, 2007) Podendo ocasionar a morte de peixes, assim como a fusão dos filamentos (PEREIRA, *et al.*, 2014). O fusionamento dos filamentos se caracteriza pela diminuição da superfície de contato com a água, dificultando assim as trocas gasosas (NIMET, *et al.* 2020). Ela é ocasionada pela hiperplasia das células epiteliais e essa lesão pode ser parcial, quando apenas parte dos filamentos é comprometida ou total, onde a hiperplasia ocorre ao longo dos filamentos (MELETTI, 2003).

O aneurisma é uma lesão que consiste no acúmulo de um grande volume de sangue, pressionando assim o epitélio lamelar (NIMET, *et al.*, 2020) Essa alteração histopatológica promove a indução da vasodilatação, dificultando dessa forma a respiração (PEREIRA, *et al.*, 2014). A presença de aneurisma nas brânquias pode estar associada a lesões parasitárias e contaminantes químicos na água (CANTANHÊDE, *et al.*, 2014).

As células de cloreto possuem importante papel de regulação de íons, no entanto, quando sua presença é elevada, pode ser indicativo de substâncias tóxicas na água, tais como metais e pesticidas (PAULINO, *et al.*, 2014).

5.5.2 Imunohistoquímica (IHQ)

Um dos principais fatores que afetam os organismos aquáticos é a disponibilidade de oxigênio dissolvido na água. Quando existe baixa quantidade de oxigênio disponível, o peixe ativa mecanismos para sobreviver nesse tipo de ambiente (BAPTISTA, 2011). Um desses mecanismos é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é uma proteína envolvida no processo de angiogênese, que consiste na formação de novos capilares e vasos sanguíneos que permitem aumentar a capacidade de transportar oxigênio (CAPP, *et al.*, 2009). Esse mecanismo de vascularização, promove um aumento das superfícies respiratórias permitindo uma circulação mais efetiva. Dessa forma, os peixes conseguem sobreviver em ambientes altamente degradados (BAPTISTA, 2011).

Todos os peixes estudados apresentaram expressão de VEGF, porém, ela foi observada em maior grau nas espécies de *P. reticulata* coletada nos pontos próximos a foz do Córrego da Prata, podendo estar relacionado com as variáveis físico-químicas da água, principalmente as baixas concentração de oxigênio dissolvido observadas nesses pontos. A angiogênese é induzida por fatores como: hipoglicemia, baixo pH, mas principalmente pela hipóxia (MELINCOVICI, *et al.*, 2018).

Atividades antrópicas, tais como lançamento de efluentes domésticos e industriais são responsáveis por alterações nas variáveis ambientais como temperatura e oxigênio, os quais influenciam diretamente nos processos fisiológicos dos animais aquáticos (ZENI, OSTRENSKY, WESTPHAL, 2016; MUNDAY, *et al.*, 2009).

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a utilização de múltiplas variáveis é eficaz para avaliação do estado ecológico de um curso d'água. Além disso, os bioindicadores se mostraram úteis no estudo, refletindo o grau de integridade do ambiente. Em todos os parâmetros analisados, ficou evidente o impacto negativo causado pela urbanização e despejo de esgoto *in natura* no Córrego da Prata.

Verificou-se que nos pontos próximos a cabeceira a qualidade da água encontra-se superior aos pontos de coleta com maior densidade populacional, no entanto, devido a intensificação da urbanização, é fundamental a continuidade do monitoramento principalmente nessas áreas, bem como a implantação de novos empreendimentos que possam causar impactos ambientais negativos no Córrego da Prata, e conseqüentemente na bacia.

A avaliação qualitativa do ambiente feita pelo Protocolo de Avaliação de Rápida de Diversidade de Habitats (PARDH) classificou os pontos à montante como naturais e os pontos à jusante como alterados.

Os parâmetros físicos e químicos apresentaram OD baixo principalmente na foz, porém de forma geral, o pH nos pontos amostrados ficaram próximo a neutralidade e apresentaram temperatura compatível com rios de regiões tropicais.

As análises microbiológicas demonstraram resultado de NMP elevado para coliformes totais e termotolerantes nos pontos urbanizados. Com relação a técnica de antibiograma, as bactérias foram resistentes apenas ao antibiótico amoxicilina+clavulanato no Ponto P2, demonstrando que a água do rio representa em vários pontos risco efetivo de contaminação bacteriana para a população.

A família Chironomidae foi encontrada em todos os pontos de amostragem, principalmente nos pontos onde havia alta influencia antrópica, representando mais de 50% do total de indivíduos coletados de macroinvertebrados bentônicos. O grupo EPT, indicadores de boa qualidade da água, foram mais encontrados no ponto referencial do Córrego Formação, seguido dos pontos próximos a cabeceira do Córrego da Prata (P1 e P2). O índice BMWP/ASPT classificou como boa as águas dos pontos à montante, e de regular a péssima os pontos à jusante.

Através da análise de ordenação NMDS foi possível observar que os pontos que ficaram espacialmente mais próximos ao P0 foram os ambientes mais conservados, os ambientes mais impactados também se agruparam.

A presença dos peixes é um fator importante no estudo de rios. Nos pontos referencial e à montante, foram encontradas a espécie *Astyanax fasciatus*, e a espécie *Geophagus brasiliensis* no P3. Em contrapartida, nos pontos P4, P5 e P6 foi verificada apenas a presença da espécie *Poecilia reticulata*, que são peixes mais resistentes a poluição hídrica. Através da análise histológica HE foi identificadas lesões nas brânquias dos *Astyanax fasciatus* apenas no ponto P1. Já na espécie *Poecilia reticulata* foi evidenciadas lesões histopatológicas em todos os pontos como fusão de filamentos parcial e total e aneurisma, demonstrando que estas espécies estão sofrendo pelas condições atuais do córrego da Prata.

A proteína VEGF foi expressa em todos os pontos, porém naqueles que apresentaram impactos urbanos evidentes como: lançamentos de efluentes e ausência de mata ciliar, a expressão foi mais acentuada.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, fica evidenciado que a urbanização causa impactos significativos ao meio ambiente, comprometendo a biota e a saúde humana. Dessa forma, considerando a importância cultural, social e ambiental do Córrego da Prata é fundamental a promoção de políticas públicas e ações que visem a melhoria da qualidade ambiental desse curso d'água e respectivamente sua área de bacia hidrográfica, visto que a água reflete o que está ocorrendo na área de montante.

Considera-se importante a continuação do monitoramento do Córrego da Prata para evidenciar as mudanças ocorridas, principalmente as análises físico-químicas que são de fácil mensuração.

Recomenda-se que esses parâmetros sejam aplicados em outras regiões com o intuito de avaliar o impacto das áreas urbanas em ecossistemas aquáticos.

Ressalta-se a importância da realização de análises complementares de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e metais pesados, com o objetivo de aprofundar o estudo do Córrego da Prata e suas fontes poluidoras.

Os projetos de educação ambiental também constituem ferramentas importantes no sentido de sensibilizar a população da importância dos cursos d'água e do papel de cada um de preservar e conservar os recursos hídricos.

Destaca-se a importância da responsabilidade do poder público municipal em acompanhar as ações e fiscalizar os serviços de esgotamento sanitário pela empresa responsável, garantindo assim, a sobrevivência do Córrego da Prata, bem comum de toda a população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.G.S., ATAIDE, C.D.G., SILVA, J.X. Microbiológica de coliformes totais e termotolerantes em água de bebedouros de um parque público de Brasília, Distrito Federal. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 7, n. 1, p. 12-17, 2018.

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**, v. 37, n. 9, p. 1098-1107, 2017. <https://doi.org/10.1002/jat.3461>.

APTE, R.S., CHEN, D.S., FERRARA, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. **Cell**, v.176, n.6, p. 1248-1264, 2019. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.021.

BALULA, T. **Avaliação dos efeitos histológicos ao nível de branquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após uma exposição a cloreto de benzalcônio**. 2011, 30p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) – Universidade Fernando Pessoa. Porto.

BAPTISTA, R.D. **O efeito da hipóxia sobre o metabolismo e a expressão dos genes HIF-1 α e VEGF do ciclídeo amazônico *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 68p., 2011.

BATISTA, H.U., BARBOLA, I.F., KLOTH, A.E.G., MILLÉO, J. Estrutura e composição da fauna de macroinvertebrados como forma de avaliação da qualidade da água do rio Verde, em Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Terra Plural**, v.4, n.2, p.241-256, 2010. DOI: 10.5212

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 260-265, 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>>

BERTAZO, K., SANTOS, C.B., PINTO, I. S., FERREIRA, A.L., FALQUETO, A. PEPINELLI, M. Distribuição de espécies de borrachudos (Diptera: Simuliidae) do Espírito Santo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, 2010.

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

BRASIL. 1997. Lei 9.433, de 08 de janeiro de 1997. Institui a política nacional de recursos hídricos, cria o sistema nacional de gerenciamento de recursos hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição federal, e altera o art. 1º da Lei 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Brasília, 09 de janeiro 1997.

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, 2014.

BORTOLOTI, K.C.S., MELONNI, R., MARQUES, P.S., CARVALHO, B.M.F., ANDRADE, M.C. Qualidade microbiológica de águas naturais quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos, **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.23, n.4, p. 717-725, 2018, doi: 10.1590/S1413-41522018169903.

BOYER, A.L., FLAMINIO, E.C.S., LAY, Y.F.L., COTTET, M. The social dimensions of a river's environmental quality assessment. **Ambio**, v.49, p. 409-422, 2019.

BUZELLI, G. M.; CUNHA-SANTINO, M. B. Análise e diagnóstico da qualidade da água e estado trófico do reservatório de Barra Bonita (SP). **Ambiente e Água**, v. 8, n. 1, p. 186-205, 2013.

CALLISTO, M., FERREIRA, W.R., MORENO, P., PETRUCIO, M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida de diversidade de habitats em atividade de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v14, n.1, p. 91-97, 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.

CANTANHÊDE, S.M., MEDEIROS, A.M., FERREIRA, F.S., FERREIRA, J.R.C., ALVES, L.M.C., CUTRIM, M.V.J., SANTOS, D.M.S. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís – MA. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.593-601, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-41626348>.

CAPP, C., ZENNIG, N., WAJNER, S., MAIA, A.L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireoide. **Revista HCPA**, v. 29, n.1, 2009.

CASTRO, D.M.P., DE CARVALHO, D.R., POMPEU, P.S., MOREIRA, M.Z., NARDOTO, G.B., CALLISTO, M. Land Use Influences Niche Size and the Assimilation of Resources by Benthic Macroinvertebrates in Tropical Headwater Streams. **Niche Size and Assimilation of Resources by Benthic Macroinvertebrates**, v.11, n.3, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0150527.

CHAGAS, F.B., RUTKOSKI, C.F., BIENIEK, G.B., VARGAS, G.D.L.P., HARTMANN, P.A., HARTMANN, M.T. Utilização da estrutura de comunidades de macroinvertebrados bentônicos como indicador de qualidade da água em rios no sul do Brasil. **Revista Ambiente e Água**, v. 12, n. 3, 2017.

CHIA, M.A., KWAGHE, M.J. Microcystins contamination of surface water supply sources in Zaria-Nigeria. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 606, 2015 doi: 10.1007/s10661-015-4829-3

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente/IBAMA. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>> Acesso em 22 de julho de 2021.

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente/IBAMA. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf> Acesso em 24 de julho de 2021.

COPASA. Audiência Pública: Qualidade da Água em Diamantina. Diamantina, 2019. Disponível em: <https://m.facebook.com/story.php?story_fbid=783587365478393&id=100014814101175> Acesso: 12 de agosto de 2021.

CUI, Q., HUANG, Y., WANG, H., FANG, T. Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage. **Environmental Pollution**, v.249, p. 24-35, 2019.

DE MORAES, M.F.P.G., BARBOLA, I.F., DUBOC, L.F. Feeding habitats and morphometry of digestive tracts of *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae), in a lagoon of high Tibagi river, Paraná state, Brazil. **Revista de Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, n.1, p. 37-45, 2004.

DIAMANTINA. 1999. Lei complementar 35 de 28 de setembro de 1999 institui o Plano diretor e estabelece normas e condições para parcelamento, uso e ocupação do solo urbano do distrito sede do município de Diamantina. Diamantina, 28 de setembro de 1999.

DIAMANTINA. 2008. Contrato de Programa que nos termos estabelecidos no convênio de cooperação de 04 de abril de 2008, entre si celebram o Estado de Minas Gerais, o município de Diamantina-MG, a COPASA e COPANOR, para prestação de serviços públicos de abastecimento de água e de esgotamento sanitário. Diamantina, 03 de dezembro de 2008.

DORIA, H.B., VOIGT, C.L., DE CAMPOS, S.X., RANDI, M.A.F. Metal pollution assessment in a Brazilian hydroelectric reservoir: *Geophagus brasiliensis* as a suitable bioindicator organism. **Revista Ambiente e Água**, v. 12, n. 4, 2017.

FERRÃO-FILHO, A.S., MOLICA, R., AZEVEDO, S.M.F.O. Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n.2, p. 225-228, 2009.

FERREIRA, W.F., PAIVA, L.T, CALLISTO, M. Índice biótico bentônico no biomonitoramento da bacia do Rio das Velhas. In: *XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos*. **Anais...** 2009.

FERREIRA, C.P., CASATTI, L. Integridade biótica de um córrego na bacia do Alto Rio Paraná avaliada por meio da comunidade de peixes. **Biota Neotropica**, v.6, n.3, 2006.

FERREIRA, V. O., SAADI, A. Paisagens culturais da bacia do Rio Jequitinhonha, em Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Geografia**, v.5, n.14, p. 02-26, out. 2013.

FRANCO, J.M., MENDES, R.C., CABRAL, F.R., MENEZES, C.D.A. O papel do farmacêutico frente a resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos, **Semana Acadêmica**. Fortaleza, v.1, n.72, 2015.

FREITAS, C.E.C; SOUZA, F.K.S. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia Amazônica. **Agrogeoambiental**. Manaus/Amazonas, 2009.

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.

GIANOTTI, A. R. C., SOUZA, M.J.H., MACHADO, E.L.M., PEREIRA, I.M.P. VIEIRA, A.D., MAGALHÃES, M.R. Análise microclimática em duas fitofisionomias do Cerrado no Alto Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.28, n.3, p. 246 - 256, 2013.

GOMIERO, L. M; BRAGA, F. M. S. Reproduction of a fish assemblage in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 2, p. 283-292, 2007.

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.

GRAÇA, B., LUNET, C., COELHO, A.S., MONTEIRO, G., FREIRE, P., SPEIDEL, A. CARVALHO, L. Angiogênese e cancro da biopatologia à terapêutica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 17, p.76-93, 2004.

GUIMARÃES, A.; RODRIGUES, A. S. L.; MALAFAIA, G. Adequação de um protocolo de avaliação rápida de rios para ser usado por estudantes do ensino fundamental. **Ambiente e Água**, Taubaté, v. 7, n. 3, p. 241-260, 2012.

HAMADA, N., NESSIMIAN, J. L. QUERINO, R.B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Editora do INPA, 2014.

INMET-Instituto Meteorológico Brasileiro. **BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>> Acesso em: 02/02/2020.

JABEEN, G., MANZOOR, F. JAVID, A., AZMAT, H., FATIMA, S. Evaluation of Fish Health Status and Histopathology in Gills and Liver Due to Metal Contaminated Sediments Exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2295-7>

JUNQUEIRA, M.V., ALVES, K.C., PAPROCKI, H., CAMPOS, M.S., CARVALHO, M.D., MOTA, H.R., ROLLA, M.E. Índices bióticos para avaliação de qualidade de água de rios tropicais- síntese do conhecimento e estudo de caso: Bacia do Alto Rio Doce. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n.49, p. 15-33, 2018.

LEIRA, M.H., CUNHA, L.T., BRAZ, M.S. MELO, C.C.V., BOTELHO, H.A., REGHIM, L.S. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **PUBVET**, v.11, n.1, p.11-17, 2017.

LINS, J.A.P.N., KIRSCHNIK, P.G., QUEIROZ, V.S., CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LUPI, C., NHACARINI, N.I., MAIZON, A. F., DE SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe On Line**, n.3, 2007.

MARTINS, I. S. **Macroinvertebrados Bentônicos Bioindicadores de Condições de Referências**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 54p. 2016.

MELETTI, P.C. **Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Universidade de São Paulo, 231p., 2003.

MELINCOVICI, C.S., BOSCA, U.B., SUSMAN, S. MARGINEAN, C.M., MIHU, C., ISTRATE, M., MOLDOVAN, I.M., ROMAN, A.L., MIHU, C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v.59, n.2, p.455-467, 2018.

MINAS GERAIS. 1999. Lei 13.199, de 29 de janeiro de 1999. Dispõe sobre a Política Estadual de Recursos Hídricos e dá outras providências, 1999.

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.

MUNDAY, P. L.; LEIS, E. J. M.; LOUGH, E. J. M., PARIS, C.B., KINGSFORD, M.J., BERUMEN, M.L., LAMBRECHTS, J. Climate change and coral reef connectivity. **Coral Reefs**, v. 28, p. 379–395, 2009. Doi: 10.1007/s00338-008-0461-9

NEVES, F.M.C.; CASTRO, F.B.G.; GODEFROID, R.S.; SANTOS, V.L.P.; WAGNER, R. (2015) Avaliação da qualidade da água do rio Bacacheri, Curitiba/PR. **Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 8, n. 4, p. 81-98.

NETO, M. E., BALZ, D.M., PEDROZO, B.G., RESENDE, T.M., SOUZA, P.O.P., CARDOZO, S.P. Análises físicas, químicas e microbiológicas das águas do Balneário Veneza na Bacia hidrográfica do médio Itapecuru, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.3, p.397-403, jul./set., 2012.

NIMET, J., NEVES, M.P., VIANA, N.P., AMORIM, J.P.A., DELARIVA, R.L. Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*) in neotropical streams: negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 58, p.1-13, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8030-y>

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, F.M., NUNES. Aplicação de protocolo de avaliação rápida para caracterização da qualidade ambiental do manancial de captação (Rio Pequeno) do município de Linhares, ES. **Natureza Online**, v. 13, n.2, p. 86-91, 2015.

OLIVEIRA, R.P.B., SIQUEIRA, A.A., NUNES, A.L.V.F., MONÇÃO, C.R. GONÇALVES, L.L.D., CHAVES, S.R., GREGÓRIO, E.L., AMARAL, D.A. Análise Microbiológica da Água para Consumo Humano em uma Comunidade do Município de Santana do Riacho – MG. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n.4, p.18552-18563, 2020.

PANTANO, G., GROSSELI, G.M., MOZETO, A.A., FADINI, P.S. Sustentabilidade no uso do fósforo: uma questão de segurança hídrica e alimentar. **Química Nova**, v. 39, n. 6, p. 732-740, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160086>

PAULINO, M. G., BENZE, T. P., SADAUSKAS-HENRIQUE, H., SAKURAGUAI, M. M., FERNANDES, J. B., FERNANDES, M. N. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: Bioaccumulation and histopathological biomarkers. **Science of the Total Environment**, v.497, n. 498, p.293–306, 2014.

PESCADOR, M. L., RASMUSSEN, A. K., HARRIS, S. C. Identification manual for the caddisfly (Trichoptera) larvae of Florida (Revised edition)'. (Department of Environmental Protection: Tallahassee), 2004.

PEREIRA, D.P., SANTOS, D.M.S., CARVALHO NETA, A.V., CRUZ, C.F., CARVALO 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, p. 1213-1221, 2014

PIEDRAS, S.R., BAGER, A., MORAES, P.R.R., ISOLDI, L.A., FERREIRA, O.G.L., HEEMANN, C. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem Santa Bárbara, Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.494-500, 2006.

PINHEIRO, I. P.; SANTOS. E. M.; MACEDO, R. M. P. R.; JUNIOR, S. M. **Proposta de Educação Ambiental e Estudos de Percepção Ambiental na Gestão do Recurso Hídrico**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Produção. Santiago de Chile, 24-26. 2001.

PIRATOBA, A. R. A., RIBEIRO, H.M.C., MORALES, G.P., GONÇALVES, W.G. Caracterização de parâmetros de qualidade da água na área portuária de Barcarena, PA, Brasil. **Revista Ambiente e Água**, v. 12 n. 3, 2017.

PONGELUPPE, A.T.; OLIVEIRA, B.D.; SILVA, E.A.; AGUILEIRA, K.K.; ZITEI, V.; BASTOS, M.F. Avaliação de coliformes totais, fecais em bebedouros localizados em uma instituição de ensino de Guarulhos. **Revista Saúde**, v. 3, n. 2, p. 5-9, 2009.

POMPEU, S.P., ALVES, C.B.M., CALLISTO, M. The Effects of Urbanization on Biodiversity and Water Quality in the Rio das Velhas Basin, Brazil. **American Fisheries Society**, v.47, p. 11–22, 2005.

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

RIGHI-CAVALLARO, K.O., SPIES, M.R. & SIEGLOCH, A.E. Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera assemblages in Miranda River basin, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Biota Neotropica**, v.10, n. 2, 2010.

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/>>

ROCHE, K.F., QUEIROZ, P., RIGHI, K.O., SOUSA, G.M. Use of the BMW and ASPT indexes for monitoring environmental quality in a neotropical stream, **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n.1, p. 105-108, 2010. doi: 10.4322/actalb.02201010.

ROCHA, R.S., PELEGRINI, L.S., CAMARGO, A.A., ABDALLAH, V.D., DE AZEVEDO, R.K. Sphincterodiplostomum musculosum (Digenea, Diplostomidae) in Geophagus brasiliensis (Perciformes, Cichlidae) collected in a lake at Dois Córregos, São Paulo, Brazil, **Ciência Rural**, v.45, n.12, p.2223-2228, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141493>

RODRIGUES, A.S.L., CASTRO, P.T.A. Protocolos de Avaliação Rápida: Instrumentos Complementares no Monitoramento dos Recursos Hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.13, n.1, p. 161-170, 2008.

SALGUEIRO, T. M. **Impacto da área urbana de Diamantina na paisagem e biota do Córrego da Palha**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, 83p.,2020.

SANTOS N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**. Santa Catarina, v.13, p. 65-66, 2004.

SEJAS, L.M., SILBERT, S. REIS, A.O., SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27-35, Rio de Janeiro, 2003.

SILVA, K.W.S.; EVERTON, N. S.; DE MELO, M.A.D. Aplicação dos índices biológicos BMWP e ASPT para avaliar a qualidade de água do rio Ouricuri. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.7, n.3, p.13-22. 2016.

SILVA, A. C., HORÁK, I., CORTIZAS, A.M., TORRADO, P.V., RACEDO, J.R., GRAZZIOTI, P.H., SILVA, E.B., FERREIRA, C.A. Turfeiras da Serra do Espinhaço Meridional- MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.1385-1398, 2009.

SNIS. Sistema Nacional de Informações em Saneamento.2019. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnosticos>>. Acesso em: 20 de julho de 2021.

SILVEIRA, C. A. Análise microbiológica da água do Rio Bacacheri, em Curitiba (PR). **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.23, n.5, p. 933- 938, 2018.

SOUSA, S.S., SILVA, W. S., MIRANDA, J.A.L., ROCHA, J. A. Análise físico-química e microbiológica da água do rio Grajaú, na cidade de Grajaú – MA. **Ciência e Natura**, v.38 n.3, p. 1615 – 1625, 2016. <https://doi.org/10.5902/2179460X23341>.

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, 2013.

SOUZA, C.O., MELO, T.R.B., MELO, C.S.B.M., MENEZES, E.M., CARVALHO, A.C., MONTEIRO, L.C.R. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan Amazônica de Saúde**, v.7, n.2, 2016. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232016000200010>.

SVENSSON, O., BELLAMY, A.S., BRINK, P.J.V., TEDENGREN, M., GUNNARSSON, J.S. Assessing the ecological impact of banana farms on water quality using aquatic macroinvertebrate community composition. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 13373–13381, 2018, doi: 10.1007.

TEIXEIRA, A. R., FIGUEIREDO, A.F.C., FRANÇA, R. F. Resistência Bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. **Revista Saúde em Foco**, n. 11, p. 853-875, 2019.

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

TOLUSSI, C.E., GOMES, A.D.O., KUMAR, A., RIBEIRO, C.S., LO NOSTRO, F.L., BAIN, P.A., SOUZA, G.B., DA CUNHÃ, R., 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.

VASCONCELOS, V. de M. M.; SOUZA, C. F. Caracterização dos parâmetros de qualidade da água do manancial Utinga, Belém, PA, Brasil. **Ambiente e Água**, Taubaté, v. 6, n. 2, p. 305-324, 2011. doi:10.4136/ambiagua.202

VALIATTI, F. B., CRISPIM, D., BENFICA, C., VALIATTI, B.B., KRAMER, C.K., CANANI, L.H. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n.2, p. 103-116, 2011.

VIEIRA, D.B., SHIBATTA, O.A. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil, **Biota Neotropica**, v.7, n.1, 2007.

VILAS BOAS, J. J. F. As Lavadeiras de Santa Clara e Bicas das Monteiras em Diamantina: Sabão, pão e tradição. **Revista eletrônica discente história.com**, n.1 p. 2-13 ,2013.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. 2.ed. Belo Horizonte: UFMG, 1996. 245 p.

YOBOUÉ, K.P., OUATTARA, N.I., BERTÉ, S., ABOUA, B.R.D., COULIBALY, J.K., KOUAMÉLAN, E.P. Structure of benthic macroinvertebrates population in an area of Mopoyem Bay (Ebrie Lagoon, Côte d'Ivoire) exposed to the discharge of a fish farm effluents. **Environ Monit Assess.** 2020 Mar 2;192(4):203. doi: 10.1007/s10661-020-8167-8. PMID: 32124054.

ZENI, T.O., OSTRENSKY, A., WESTPHAL, G.C. Respostas adaptativas de peixes a alterações ambientais de temperatura e de oxigênio dissolvido. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.3, p.01-16, 2016.

ANEXOS

ANEXO A- Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidade de Habitats (PARDH)

Localização:	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

(Continua)

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 frequentemente 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.
13. Frequência de rápidos	Rápidos relativamente frequentes; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 5 e 7.	Rápidos não frequentes; 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 (prevalendo 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

(Continua)

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.
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.

(Continua)

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 frequentes. 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; frequentes 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 distribuídos no rio, substrato com perifíton.	Algas filamentosas ou macrófitas em poucas pedras ou alguns remansos, perifíton abundante e biofilme.	Ausência de vegetação aquática no leito do rio ou grandes bancos macrófitas (p.ex. aguapé).

ANEXO B- NMP com limite de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados para cada diluição (10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL)

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

(Continua)

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 - 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, Gripterygidae, Hydroscaphidae, 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, Leptohiphidae, 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, Dugesiiidae, 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

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 (HE)

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 fêrrica	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 Imunohistoquímica (IHQ). Tampão PBS (pH: 7,2 ~7,4). Tampão citrato (pH 6,0). VEGF concentração 1:1000 (PBS).

Protocolo de Imunohistoquímica – Dia 1	
Xilol I (15')	15'
Xilol II (15')	15'
Álcool etílico 100% I (5')	5'
Álcool etílico 100% II (5')	5'
Álcool etílico 95% (5')	5'
Álcool etílico 70% (5')	5'
Água destilada (5')	5'
Tampão citrato (temperatura ambiente) (5')	5'
Tampão citrato - temperatura 95°C (30')	30'
Água destilada sob agitação (2')	2'
Água destilada (2')	2'
Tampão PBS sob agitação (5')	5'
Bloqueio da Peroxidase Endógena 3% (4°C - 8°C) (30')	30'
Tampão PBS I sob agitação (5')	5'
Tampão PBS II (5')	5'
Tampão PBS III (5')	5'
Secagem com papel filtro e contorno com caneta histológica no entorno dos tecidos	
Protein Block (5')	5'
Anticorpo Primário - HSP70 (PBS no controle) (20h)	20h

(Continua)

Protocolo de Imunohistoquímica – Dia 2

Rinsagem em tampão PBS	
Tampão PBS I sob agitação (5')	5'
Tampão PBS II (5')	5'
Tampão PBS III (5')	5'
Secagem com papel filtro	
Anticorpo Secundário (30')	30'
Rinsagem em PBS	
Tampão PBS I sob agitação (5')	5'
Tampão PBS II (5')	5'
Tampão PBS III (5')	5'
Rinsagem em água destilada	
DAB (2')	2'
Rinsagem em água destilada	
DAB (2')	2'
Água destilada sob agitação (5')	5'
Água destilada (5')	5'
Hematoxilina (20'')	20''
Água corrente (20')	20'
Álcool etílico 70% (2')	2'
Álcool etílico 95% (2')	2'
Álcool etílico 100% I (2')	2'
Álcool etílico 100% II (2')	2'
Xilol I (2')	2'
Xilol II (2')	2'
Xilol III	Montagem das lâminas
