



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA COMPARADA

JULIANA PAROLIN CECCON

Indicadores biológicos para avaliação de riachos Neotropicais: protocolo de avaliação rápida e biomarcadores em *Astyanax* spp.

Maringá
2016

JULIANA PAROLIN CECCON

Indicadores biológicos para avaliação de riachos Neotropicais: protocolo de avaliação rápida e biomarcadores em *Astyanax* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Comparada.
Área de concentração: Biologia das Interações Orgânicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Evanilde Benedito
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Carmem Lúcia de Mello S. C. Rocha

Maringá
2016

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

C387i Ceccon, Juliana Parolin, 1981-
Indicadores biológicos para avaliação de riachos Neotropicais: protocolo de avaliação rápida e biomarcadores em *Astyanax* spp. / Juliana Parolin Ceccon. -- Maringá, 2016.
150 f. : il. (algumas color.).
Tese (doutorado em Biologia Comparada)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2016.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Evanilde Benedito.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Carmem Lúcia de Mello S. C. Rocha.
1. Toxicologia - Recursos hídricos - Paraná (Estado). 2. Toxicologia aquática. 3. Indicadores (Ecologia). 4. Biomonitoramento. 5. Recursos hídricos - Impacto ambiental. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

CDD 23. ed. -577.6427098162
NBR/CIP - 12899 AACR/2

JULIANA PAROLIN CECCON

Indicadores biológicos para avaliação de riachos Neotropicais: protocolo de avaliação rápida e biomarcadores em *Astyanax* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Comparada pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Evanilde Benedito
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof.^a Dr.^a Graciana Freitas Palioto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UFTPR)

Prof.^a Dr.^a Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof.^a Dr.^a Gislaine Iachstel Manetta
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Aprovada em: 22 do mês fevereiro de 2016.

Local de defesa: Anfiteatro 205, Bloco G80, *campus* Sede da Universidade Estadual Maringá.

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Osiris e Dalva pelo carinho, amor e total dedicação, por acreditarem na minha capacidade e por cuidarem de mim quando precisei durante mais uma etapa importante de minha vida.

A minha querida e amada vozinha Laura que não pode estar presente até o fim, mas vivenciou parte dessa jornada, pelas suas palavras carinhosas e todo o seu amor, essenciais para o meu emocional, saudade eterna!

A minha irmã Aline pelo amor, companheirismo e incentivo, por ser mais que uma irmã, ser minha amiga e me ouvir e motivar nos momentos mais críticos dessa jornada.

A minha amiga e sobrinha Arieli pelo amor, carinho, companheirismo e palavras de conforto em todos os momentos que precisei.

A minha amiga querida Dani, pela paciência, apoio e incentivo e por entender a minha ausência nesses quatro longos anos.

Aos meus irmãos Alessandro e Luciano, pelo apoio e auxílio e por compreender a minha ausência em muitos momentos durante o período em que cursei o doutorado.

Aos meus queridos e amados amigos e irmãos Tânia, Rubia e Thiago pela amizade e pelo auxílio em momentos importantes deste trabalho.

Aos meus demais amigos e familiares pelo carinho, amizade, conselhos, incentivo, palavras de conforto e por compreender todas as vezes que prometi estar presente, mas não pude estar.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Evanilde Benedito pela amizade, carinho e paciência com que transmitiu seus conhecimentos e conduziu a minha orientação, pela confiança depositada e oportunidade concedida quando me aceitou em seu laboratório.

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Carmem Lucia M.S.C. Rocha por todo o suporte físico e emocional, por me ouvir pacientemente há tantos anos, por ter acreditado no meu potencial e aceito fazer parte deste trabalho.

Ao Prof. Ciro Alberto de Oliveira, por disponibilizar materiais e equipamentos necessários para realização deste trabalho, e colaborar com seus conhecimentos e considerações acerca do projeto.

A Prof.^a Sonia pelo carinho com que ajudou na preparação de material para a pesquisa e por disponibilizar seu laboratório.

A Prof.^a Claudia, por disponibilizar horários para minhas análises em seu microscópio, e por ceder o laboratório.

A minha querida amiga e parceira de pesquisa Ivaldete por toda sua contribuição nas análises, companhia e hospedagem durante as coletas.

Aos queridos amigos Samuel, Andressa e Dandie da Universidade Federal do Paraná, pela disposição em ajudar em todos os momentos que precisei.

Aos meus queridos amigos Fábio e Alessandra da Universidade Estadual de Maringá, pela contribuição valiosa, pela disposição as viagens de coleta e a ficar horas processando material no laboratório, em alguns momentos madrugadas e finais de semana.

Aos meus colegas Vivian, Gislaine, Gustavo, Daiany, Patrícia, Marcelo e a todos os demais que de alguma forma ajudaram neste trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá.

Aos técnicos Donizete e Marly pela constante disposição em ajudar, colaboração e apoio no decorrer dos experimentos.

Ao Sr. Nino pela disponibilidade em ajudar em tantas ocasiões.

Aos professores do Laboratório de Limnologia da UEM, em especial a Du Carmo, pelo auxílio na realização das análises limnológicas.

Aos amigos Elder, Henrique e Jorge que tão generosamente ajudaram nas coletas.

Ao Sr. Motorista do trator de uma Usina de Cana-de-açúcar em Tuneiras, que gentilmente nos guinchou por meio quilômetro, se ele não estivesse lá naquele momento não teríamos saído tão facilmente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada pela oportunidade concedida.

A Sanepar pelas informações e pelo suporte disponibilizando material e equipamentos para coleta.

Aos membros da banca, pela participação e pelas contribuições.

Ao CNPq pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos amigos e colegas que não mencionei e a todos aqueles que, pessoalmente ou profissionalmente, contribuíram para a realização deste trabalho ou torceram por seu término bem-sucedido!

Indicadores biológicos para avaliação de riachos Neotropicais: protocolo de avaliação rápida e biomarcadores em *Astyanax* spp.

RESUMO

Estabelecer relação entre as respostas de diferentes métricas e níveis de organização biológica, pressupondo-se que, quando ambos os indicadores ecológicos e toxicológicos são igualmente úteis, demonstram maior confiabilidade em diagnosticar que o ecossistema é saudável. Foram utilizados protocolo de avaliação rápida (PAR) adaptado ao arenito Caiuá, parâmetros físicos e químicos da água e populacionais, índices somáticos e biomarcadores morfométricos e bioquímicos em peixes nativos (*Astyanax* spp.). Como biomarcadores bioquímicos foram utilizados a atividade da catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST) no fígado e da acetilcolinesterase (AChE) no músculo, concentração de glutatona (GSH), peroxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas (PCO) no fígado e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile. A genotoxicidade foi estimada pelo ensaio cometa em sangue e brânquias, e a mutagenicidade pelo micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN). Os ambientes incluíram três microbacias, localizadas no noroeste do estado do Paraná: ambiente referencial, o rio dos Índios inserido em uma Unidade de Conservação; manancial de abastecimento público, o ribeirão Bolivar; e futuro manancial não protegido, o rio Ligeiro. O PAR possibilitou a caracterização do estado de conservação dos ambientes e a identificação de pequenas alterações nos atributos físicos dos *habitats*. Os demais indicadores ecológicos e biomarcadores apresentaram resultados diferenciados como lesões histológicas e alterações nos peixes que refletiram condição de risco e fragilidade em potencial dos ambientes em questão resultante de possíveis estressores antrópicos e naturais.

Palavras-chave: Recursos hídricos. Impacto. Avaliação ecológica. Biomonitoramento. Toxicologia aquática.

Biological indicators for Neotropical streams evaluation: rapid assessment protocol and biomarkers in *Astyanax* spp.

ABSTRACT

Establish the relationship between the answers of different metrics and levels of biological organization, assuming that when both ecological and toxicological indicators are equally useful they demonstrate greater reliability in diagnosing the ecosystem is healthy. The study included the application of a rapid assessment protocol adapted to the sandstone Caiuá (RAP), population and water physicochemical parameters, somatic indices and the use of morphometric and biochemical biomarkers in native fish (*Astyanax* spp.). As biochemical biomarkers it was used the activity of catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) in the liver, acetylcholinesterase (AChE) activity in muscle, glutathione concentration (GSH), lipid peroxidation (LPO), protein carbonylation (PCO) in the liver and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the bile. The genotoxicity was estimated by comet assay in blood and gills, and the mutagenicity by micronucleus (MN) and nuclear morphological changes (NMC). The study included three watersheds located in northwestern Paraná State: referential environment, the Indios River, inserted in a protected area; public supply spring, the Bolivar stream; and future unprotected spring, the Lideiro River. The RAP enabled the characterization of the environments conservation status and the identification of small changes in physical attributes of *habitats*. The other ecological indicators and biomarkers showed different results as injuries and morphological and physiological changes in fish, reflecting a potential risk and fragility condition of the environments resulting from possible anthropogenic and natural stressors.

Keywords: Water resources. Impact. Ecological assessment. Biomonitoring. Aquatic toxicology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AChE – acetilcolinesterase
ALFAC – fixador a base de AL = álcool, F=formol, AC= ácido acético glacial
AMN – alterações morfológicas nucleares
APAs - Áreas de Proteção Ambiental
ATC – iodeto de acetilcolina
CAT – catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DDT - diclorodifeniltricloroetano
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DTNB – ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EC – Ensaio Cometa
EDTA – ácido etileno diamino tetracético (Ethylenediaminetetracetic Acid)
EO – Estresse Oxidativo
ERO – espécie(s) reativa(s) de oxigênio
FOX – do inglês Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method
GSH – glutationa
GST – glutationa S-transferase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HO• - radical hidroxila
HPAs – hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IGS – Índice gonadossomático
IHS – Índice hepatossomático
LPO – peroxidação lipídica (do inglês lipid peroxidation)
Ls – comprimento padrão (do inglês Length standard)
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MFO- oxigenases de função mista
ML – microscopia de luz
MN – micronúcleo píceo
MT – metalotioneínas
O₂•- - ânion superóxido
OD – Oxigênio dissolvido
OH – Radical hidroxila
PAR – Protocolo de avaliação rápida
PBS – tampão fosfato salino (do inglês phosphate buffer saline)
PCBs – bifenilas policloradas
PCO – carbonilação de proteínas (do inglês protein carbonyl content or protein carbonylation)
RES sistema retículo endotelial
ROOH – hidroperóxido(s) orgânico(s)
UC – Unidade de Conservação

Tese elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science* (ANEXO 2). Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/ambiagua/iinstruc.htm>

e *Science of the Total Environment* (ANEXO 4). Disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/science-of-the-total-environment/0048-9697/guide-for-authors#1002>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 AVALIAÇÃO ECOLÓGICA INTEGRADA	17
2.2 CRITÉRIOS PARA UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES	19
2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES	22
2.4 BIOMARCADORES	23
2.4.1 Índices morfométricos	23
2.4.2 Biomarcadores histológicos	26
2.4.3 Danos oxidativos e atividade antioxidante	30
2.4.4 Biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade	35
2.5 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS QUE ATUAM COMO FATORES LIMITANTES	36
2.6 QUALIDADE DE ÁGUA	38
2.7 OS PEIXES COMO BIOMONITORES	41
3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	43
4 OBJETIVOS	45
4.1 OBJETIVO GERAL	45
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
REFERÊNCIAS	46
4 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL EM RIACHOS NEOTROPICAIS: ESTUDO DE CASO DE MANANCIAIS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO	64
RESUMO	64
4.1 INTRODUÇÃO	64
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	66
4.2.1 Caracterização da área de estudo	66
4.2.2 Protocolo de avaliação rápida	68
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
REFERÊNCIAS	77
5 OS BIOMARCADORES EM MENORES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO SÃO MAIS SENSÍVEIS À ESTRESSORES AMBIENTAIS DO QUE AQUELES QUE AVALIAM NÍVEIS SUPERIORES?	81

5.1 INTRODUÇÃO.....	81
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
5.2.1 Área de estudo	83
5.2.2 Parâmetros físicos e químicos da água	85
5.2.3 Amostragem de peixes e material biológico.....	85
5.2.4 Proporção sexual.....	86
5.2.5 Morfométricos	86
5.2.6 Histologia e Microscopia eletrônica de varredura	86
5.2.7 Análise bioquímica	87
5.2.8 Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade.....	89
5.2.9 Resposta de biomarcador integrado	90
5.2.10 Procedimentos Estatísticos	91
5.3 RESULTADOS	92
5.4 DISCUSSÃO.....	102
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
REFERÊNCIAS	114
6 CONCLUSÕES GERAIS	126
APÊNDICE A – Protocolo aprovado pelo Comitê de Conduta no uso de animais em experimentação da UEM (112/2011-CEUA/UEM)	128
APÊNDICE B – Metodologia histológica e eletrônica de varredura	129
ANEXO 1 - Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011.....	132
ANEXO 2 - Instruções aos autores - Ambigua	137
ANEXO 3 - Guide for authors Science The total environment.....	143

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os ambientes lóticos, nas últimas décadas, têm sofrido considerável redução da qualidade dos seus recursos em decorrência de impactos antrópicos. As principais modificações estão associadas a urbanização e exploração do solo. Em muitos casos, as intervenções que ignoram os processos ecossistêmicos acabam por reduzir substancialmente a capacidade de renovação da água dos rios e aquíferos em termos de quantidade e qualidade (MATHEUS; TUNDISI, 1988; CUNHA, 2001; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008). Quando o corpo hídrico tem sua capacidade autodepuradora superada, os contaminantes ficam mais biodisponíveis a biota aquática e seus efeitos tóxicos induzem alterações e lesões que se refletem na sobrecarga ou limitação dos sistemas fisiológicos, redução do crescimento, prejuízos à reprodução, predisposição à doenças e redução da capacidade de resistência e adaptação a estressores adicionais (ADAMS et al., 1993; EUFEMIA et al., 199; Van der OOST et al., 2003).

Com a exploração intensificada dos recursos hídricos, cresce também a necessidade de monitorar a sua qualidade (RODRIGUES; CASTRO, 2008). A identificação das alterações em macro escala e a compreensão dos processos envolvidos na mudança das características dos *habitats* constituem etapa fundamental em programas de monitoramento (MORENO; CALLISTO, 2006). Objetivando aumentar a eficiência dos sistemas de detecção de impactos ambientais, abordagens qualitativas estão sendo empregadas em conjunto com métodos quantitativos. O uso combinado destas ferramentas permite detectar as causas e avaliar os efeitos de estressores sobre os ecossistemas aquáticos (BUSS et al., 2008).

A aplicação de biomarcadores em multinível vem sendo discutida como um instrumento importante para elevar a sensibilidade na detecção de situações de risco ou fragilidade em potencial dos ecossistemas (BEROYA-EITNER, 2015). A utilização de um conjunto de indicadores ecológicos tem sido incentivada na última década em programas de monitoramento ambiental. A análise integrada, utilizando diferentes biomarcadores e indicadores ecológicos, pode superar a dificuldade de mensurar e relacionar os efeitos de múltiplos estressores (naturais e antrópicos) em diferentes níveis da organização biológica e o meio abiótico (SANCHEZ e PORCHER, 2009; CORTES et al., 2013).

A integração multinível possibilita também maior clareza nas interpretações com relação a qualidade do ecossistema. Esta percepção surgiu justamente de casos em que foi

encontrado um acordo total entre as duas respostas, ou seja, em níveis diferentes da organização. Quando ambos os indicadores ecológicos e ecotoxicológicos são bons, há uma confiança maior em concluir que o ecossistema é saudável. Por outro lado, quando ambos os indicadores apontam para alterações em indivíduos e populações, também pode-se chegar à conclusão sobre o grau de impacto ou a péssima qualidade do sistema (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

A bacia do rio Ivaí é responsável pela drenagem de uma área de 35.845 km² que abrange vários municípios, entre eles o de Cianorte - Paraná. Devido ao rápido desenvolvimento a partir da década de 1950, que ocasionou um intenso desmatamento, e a consequente ocupação da área para a construção de cidades e para cultivo e pastoreio, ocorreram alterações que se refletem na degradação dos recursos hídricos da região. Atualmente, a planície do rio é primeiramente utilizada para a pecuária e para o cultivo de cana de açúcar e secundariamente para o cultivo de milho e de soja (SANTOS et al., 2008).

O município de Cianorte detém uma rica rede hidrográfica e apresenta várias microbacias dentro do seu território com distintos níveis de alterações antrópicas. De acordo com a Agência Nacional de Águas (2014), o município possui 74% do seu abastecimento suprido pelo ribeirão Bolivar e 24% por um conjunto de poços artesianos (mananciais subterrâneos). Ambos os sistemas de captação de água necessitam ser ampliados. A ampliação requer uma investigação pormenorizada com relação aos seus corpos hídricos levando em consideração a expansão urbana em direção as reservas florestais e aos mananciais da região (BALDO; SILVEIRA, 2009).

Propôs-se avaliar a qualidade da água de riachos neotropicais, com diferentes níveis de interferência antrópica, por meio de um conjunto de biomarcadores englobando diferentes níveis da organização biológica. Além disso, como indicador ecológico, o PAR adaptado ao arenito Caiuá (CIONEK et al., 2011) foi empregado para avaliar trechos diferentes em três rios situados na Região Noroeste do Paraná, Município de Cianorte. A utilização do PAR visou complementar os resultados obtidos por parâmetros físicos, químicos e biológicos, acreditando assim que a análise integrada desses resultados disponibilizará informações relevantes sobre a qualidade dos recursos hídricos dos mananciais avaliados neste trabalho. Estas informações também fornecerão subsídios para escolha de um novo manancial de abastecimento público para o município de Cianorte.

O biomonitor utilizado foi o *Astyanax* spp. considerado um importante biomodelo em avaliações ecotoxicológicas. Este gênero apresenta sensibilidade a mudanças em seu ambiente natural e possui grande adaptabilidade a diferentes *habitats*. Além disso, são importantes na

cadeia alimentar, fazendo parte da dieta de variados vertebrados, como mamíferos aquáticos, diversas aves e alguns anfíbios e répteis (GOMIERO; BRAGA, 2003).

Para determinar a qualidade da água e potencial tóxico foram empregados parâmetros físicos e químicos, métricas populacionais, histopatologia do fígado e microestrutura das brânquias bem como atividade de sistemas anti-oxidantes catalase (CAT), concentração de glutathione (GSH), atividade das glutathione S-transferase (GST), quantificação de pró-oxidantes peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO). Além disso, determinou-se a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo, quantificou-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile e para avaliar a genotoxicidade foi utilizado o ensaio cometa em sangue e brânquias e a mutagenicidade pelo teste do micronúcleo (MN) e de alterações morfológicas nucleares (AMN).

A utilização de uma metodologia integradora de resposta de biomarcadores foi aplicada, o “Integrador de Respostas de Biomarcadores” (IBRv2) (SANCHEZ et al., 2013). O IBR permitiu avaliar as respostas específicas de biomarcadores em cada local analisado (Beliaeff e Burgeot, 2002). Estes índices podem ser instrumentos importantes para chegar a um bom diagnóstico ecológico (WO et al., 2009; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AVALIAÇÃO ECOLÓGICA INTEGRADA

A complexidade estrutural e funcional de ecossistemas aquáticos dificulta a compreensão e identificação dos mecanismos e efeitos de uma variedade de estressores sobre os organismos (CAIRNS et al., 1993). Uma mistura de produtos químicos e agentes nocivos, especialmente em meio hídrico, coexiste em diferentes formas, biodisponibilidade e toxicidade. A exposição a estas misturas ocorre simultaneamente e sua interação com os sistemas biológicos pode ser aditiva, antagônica ou sinérgica (LAM, 2009). Devido a isso, pesquisas envolvendo a qualidade de água se deparam com a dificuldade de mensurar e integrar os efeitos de estressores (naturais e antrópicos) nos diferentes níveis de organização biológica.

A utilização de um conjunto de indicadores ecológicos tem sido incentivada na última década em programas de monitoramento ambiental, como uma forma de aumentar a confiabilidade e compreensão dos resultados de análises biológicas individuais (SANCHEZ; PORCHER, 2009; CORTES et al., 2013). A aplicação de diferentes ferramentas em multinível vem sendo discutida como uma possibilidade de reduzir os “falsos positivos” (LAM, 2009) e elevar a sensibilidade na detecção de situações de risco ou fragilidade em potencial. Os métodos mais comumente utilizados estão limitados a uma medida de exposição ou estado e, nesse caso, são insuficientes para expor uma condição de vulnerabilidade ecológica (BEROYA-EITNER, 2015). A vulnerabilidade ecológica é entendida como o potencial de um ecossistema de modular a sua resposta a estressores ao longo do tempo e do espaço, onde esse potencial é determinado por características que incluem vários níveis de organização, como o solo, biorregião, espécie, organismo, tecido e célula. É uma estimativa da incapacidade de um ecossistema de tolerar fatores de estresse ao longo do tempo e do espaço (WILLIAMS; KAPUTSKA, 2000).

Estes conceitos refletem a complexidade inerente aos sistemas ecológicos, tornando a sua vulnerabilidade ainda mais difícil de mensurar ou ser reduzida a uma ou poucas métricas. Tal complexidade é a razão pela qual, apesar dos esforços consideráveis no desenvolvimento de indicadores ambientais nas últimas décadas, ainda não existirem aqueles considerados "chave" para medir eficientemente, de um modo geral, a saúde de um ecossistema (BEROYA-EITNER, 2015). O que tem sido feito para superar essa dificuldade é a seleção de parâmetros relativos a mudanças temporais e espaciais em sistemas biológicos que possam refletir alterações nas condições e na qualidade ambiental. Esta abordagem é chamada de

biomonitoramento e pode englobar a avaliação de efeitos e presença de resíduos químicos nos tecidos dos organismos vivos por meio de ensaios biológicos específicos (LAM, 2009).

O papel primordial dos indicadores é medir a resposta do ecossistema a perturbações antrópicas. As respostas constituem características mensuráveis da estrutura (genética, população, *habitat* e padrão da paisagem), composição (genes, espécies, populações, comunidades e tipos de paisagem) ou função (genéticos, fisiológicos, dinâmica populacional dos ecossistemas, e processos de perturbação da paisagem) de sistemas ecológicos (NIEMI; MCDONALD, 2004). Os bons indicadores biológicos permitem isolar os principais aspectos do ambiente de uma ampla matriz de sinais, devem manifestar-se e ser mensuráveis em todos os níveis da organização biológica (em uma escala hierárquica que pode ser em nível celular, organismo, população, comunidade e ecossistema). A medição de um conjunto de indicadores em todos esses níveis de organização é necessária para avaliar a integridade ecológica (Van der OOST et al., 2003).

Um indicador biológico é constituído por uma espécie ou grupo de espécies que prontamente refletem o estado abiótico ou biótico de um ambiente (GERHARDT, 2015). Segundo Adams et al. (2001) este termo também pode representar respostas biológicas expressas a partir dos níveis biomoleculares para níveis de organização mais elevados (população e comunidade). Algumas características gerais devem ser consideradas na seleção de bioindicadores, tais como a relevância biológica, relevância metodológica e relevância para a sociedade (BURGER; GOCHFELD, 2001). Outros aspectos também são importantes na escolha como a sensibilidade do organismo, posição em uma comunidade, probabilidade de exposição, abundância na distribuição geográfica e ecológica (SEDEÑO-DÍAZ; LÓPEZ-LÓPEZ, 2013).

Os efeitos de contaminantes em organismos aquáticos induzem a mudanças bioquímicas que podem se refletir na sobrecarga ou limitação dos sistemas fisiológicos, redução do crescimento, prejuízos à reprodução, predisposição à doenças e redução da capacidade de resistência e adaptação a estressores adicionais. Especialmente as espécies próximas ao topo da cadeia alimentar, geralmente consideradas como integradores de condições ambientais, podem refletir a saúde dos ecossistemas aquáticos (ADAMS; GREELEY, 2000), e, portanto, são excelentes indicadores da saúde relativa dos ecossistemas aquáticos e as suas bacias hidrográficas (FAUSCH et al., 1990).

Os parâmetros biológicos que medem comportamentos, fisiologia, bioquímica, integridade celular, expressão e estrutura genômica são considerados biomarcadores. Em um contexto mais amplo este conceito também pode incluir parâmetros em todos os níveis de

organização biológica, desde respostas moleculares e bioquímicas a mudanças comportamentais e população/comunidade (HUGGETT et al., 1992; PEAKALL; SHUGART, 1993). Embora não explicitamente contido na maioria das definições, o uso do termo "biomarcador" ou "resposta biomarcadora" é muitas vezes restrito a alterações celulares, bioquímicas, moleculares, fisiológicas ou que são avaliadas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos de um organismo e são indicativos de exposição e/ou efeito de xenobióticos (PEAKALL; SHUGART, 1998).

De acordo com Depledge (1993), um biomarcador denifi-se por uma variação bioquímica, celular, fisiológica ou comportamental que pode ser medida em amostras de tecido ou fluido corporal ou em nível de organismos inteiros que fornece evidência de exposição e/ou de efeito a um ou mais poluentes químicos (e/ou radiações). Para Academia Nacional de Ciências dos EUA o termo "biomarcador" define uma variação induzida xenobioticamente em componentes celulares ou processos bioquímicos, estruturas ou funções que possam ser mensuráveis em um sistema biológico ou uma amostra (LAM, 2009). Outra definição descreve ainda que, os biomacadores são indicadores quantitativos de alterações no sistema biológico que respondem a uma (ou ambas) exposição e/ou doses de substâncias xeonobióticas, que conduzem a efeitos biológicos (LAM; GRAY, 2003).

Todas estas definições limitam às mudanças a nível de organismo. A razão para isso está no fato de que uma das principais funções de um biomarcador é supostamente fornecer sinais de alerta precoce, pois geralmente as mudanças ocorrem inicialmente em baixos níveis de organização biológica antes que as populações possam ser afetadas. Pressupõem-se, portanto, que, avaliar as respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas que precedem as que ocorrem em níveis de organização mais elevados, possibilitará a antecipação de ações e medidas de programas de gestão e conservação dos ambientes (ANZECC, 1992) antes que alterações irreversíveis alcancem toda a comunidade (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

2.2 CRITÉRIOS PARA UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES

Os critérios para a seleção de biomarcadores em biomonitoramento têm sido amplamente discutidos na literatura (LAM; GRAY, 2003; Van der OOST et al., 2003; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003; WU et al., 2005; FRÄNZLE, 2006; LAM, 2009).

Algumas vantagens dos biomarcadores em relação as análises físicas e químicas tradicionais são:

- 1) avaliar a biodisponibilidade e interações de contaminantes no meio ambiente;

2) estimativas temporais sobre os níveis de contaminantes ambientais (ou estresse), reduzindo assim a necessidade e o custo para a amostragem e análise frequente, especialmente considerando que as flutuações de níveis de contaminantes são elevadas no ambiente;

3) concentração de contaminantes em tecido biológico é frequentemente mais elevada, tornando mais fácil análise químicas quantitativas;

4) os efeitos adversos da exposição podem ser relacionados com contaminantes, proporcionando assim uma compreensão mecanicista de efeitos e permitindo o estabelecimento de relações causais;

5) e os efeitos biológicos medidos podem ser mais significativamente associados a consequências ambientais, permitindo o direcionamento de medidas de conservação (MCCARTHY; SHUGART, 1990; MAYER et al., 1992; FOSSI et al., 1994; WU, 1999).

Acredita-se que geralmente biomarcadores em níveis biológicos inferiores (moleculares e bioquímicos) respondam de forma mais rápida do que aqueles em hierarquias superiores (fisiológica, citológica e organismo), e portanto, poderiam proporcionar o alerta precoce de alterações ambientais (WU et al., 2005).

Isto não diminui o valor e a necessidade da avaliação dos níveis hierárquicos superiores de organização biológica, tais como os índices morfométricos, fatores condicionantes e incidências patológicas que indicam a ocorrência de consequências ambientais adversas como por exemplo o declínio da população e diminuição da diversidade de espécies (WU et al., 2005). Na verdade, os efeitos observados em níveis hierárquicos superiores são mais relevantes pois indicam que a capacidade de adaptação das espécies de fato foi superada e os prejuízos podem ter ultrapassado o ponto onde não se pode reverter ou reduzir os riscos (van der OOST et al., 2003).

A identificação de efeitos deletérios sobre as populações é uma tarefa mais difícil. Estes efeitos tendem a se manifestar apenas após longos períodos de tempo. Neste caso os biomarcadores em níveis menores da organização biológica seriam mais indicados (BAYNE et al., 1985). A Figura 1 mostra a ordem sequencial de respostas aos poluentes para o estresse dentro de um sistema biológico e apresenta uma comparação entre os prós e contras de biomarcadores e bioindicadores em vários níveis de organização biológica.

Não é sempre que o estresse em indivíduos é seguido por problemas em nível de população, pois as espécies podem se adaptar. Na verdade, o estresse ambiental pode induzir a uma resposta primária, o que pode levar a mudanças no comportamento ou nas reações de adaptação e de compensação de lesões (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003). Biomarcadores podem expressar tais mudanças, o que indica uma exposição a um meio

perturbado. Em alguns casos, a resposta de um biomarcador é típica à poluição química por classes específicas de compostos, como por exemplo os metais pesados (mercúrio, cádmio, chumbo, zinco entre outros), que são responsáveis pela indução da síntese de metalotioneína ou os organoclorados (bifenilas policloradas, dioxinas, congêneres do DDT) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs), que induzem as oxigenases de função mista envolvidas em suas biotransformações e eliminação (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

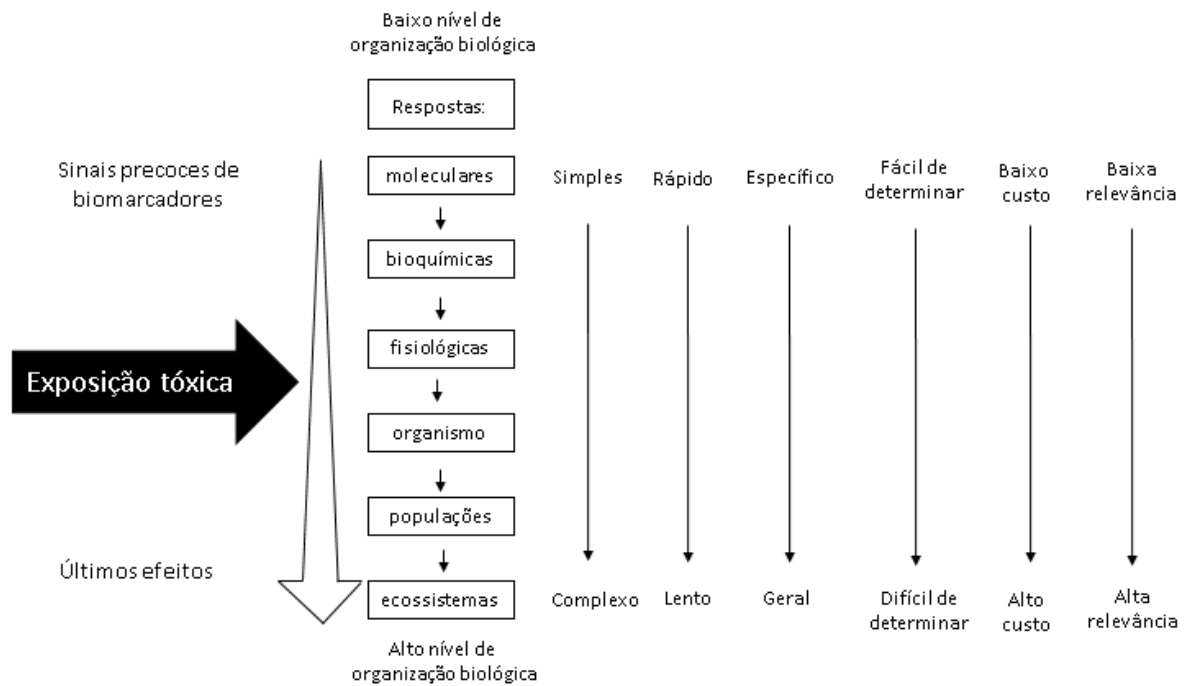


Figura 1. Representação esquemática da ordem sequencial de respostas aos poluentes dentro de um sistema biológico e comparação entre os pros e contras de biomarcadores em diferentes níveis hierárquicos (Modificado de Bayne et al., 1985 e Connell et al., 1999).

Os mecanismos de desintoxicação podem falhar em situações de exposição a contaminantes e estresse persistente. Então os processos de adaptação são insuficientes para evitar a toxicidade, isso resulta em dano celular e alterações fisiológicas caso as lesões não possam ser reparadas ou compensadas. Alguns biomarcadores são capazes de expressar toxicidade. Este tipo de biomarcador não é apenas útil, mas também absolutamente necessária para relacionar as mudanças no nível individual às perturbações em nível populacional (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem responder ao estresse tóxico com diferentes graus de especificidade. A classificação baseia-se na resposta dos organismos considerando exposição e/ou o efeito (magnitude da resposta do organismo ao poluente) (BROEG et al., 2005; ROJAS-GARCÍA et al., 2011; Van der OOST et al., 2003).

1. biomarcadores de exposição: representados por respostas como indução ou inibição de enzimas específicas envolvidas na biotransformação e desintoxicação como consequência da exposição a substâncias químicas (BROEG et al., 2005).

2. biomarcadores de efeito: são as alterações em um sistema biológico que reflete deficiência qualitativa ou quantitativa resultante da exposição (ROJAS-GARCÍA et al., 2011) incluindo as respostas mensuráveis em nível bioquímico, fisiológico ou outras alterações dentro dos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que pode ser associado à um estabelecido ou possível prejuízo para saúde ou uma doença (van der OOST et al., 2003),

3. biomarcadores de susceptibilidade: indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo em resposta à exposição a substâncias específicas (xenobióticos), incluindo fatores genéticos e alterações nos receptores que alteram a sensibilidade de um organismo a essa exposição (Van der OOST et al., 2003).

Ao avaliar os efeitos induzidos por contaminantes químicos à biota (alteração biológica) é importante considerar alguns aspectos de adequabilidade dos biomarcadores. Em sistemas naturais, os organismos geralmente são expostos não somente a um único contaminante, mas a uma mistura de diferentes substâncias (RAND et al., 1995). Dependendo da escolha dos biomarcadores, a bioavaliação pode até superar as análises químicas por detectar efeitos subletais nos organismos e apresentar respostas à ação de misturas complexas de poluentes (BARTELL et al., 2006). Por exemplo, biomarcadores de estresse oxidativo, assim como avaliações morfológicas e histológicas podem ser utilizadas de forma preditiva, mesmo para concentrações não detectáveis de contaminantes pelos métodos analíticos, mas suficientes para causar alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente aquático (WALKER et al., 1996).

Para se obter um bom diagnóstico ecológico recomenda-se que, a utilização de biomarcadores ocorra em conjunto com outras metodologias de análises ambientais, contemplando níveis hierárquicos diferentes (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003; WU et al., 2005). A integração multinível possibilita maior confiabilidade nas interpretações em relação a qualidade dos ecossistemas. Embora em ecotoxicologia essa abordagem seja

relativamente nova e, portanto, são poucos os trabalhos que utilizam (englobando diferentes escalas espaciais, temporais, biológicas e ecológicas). Esta percepção surgiu justamente de casos em que foi encontrado um acordo total entre as duas respostas, ou seja, em níveis diferentes de organização. Na verdade, quando ambos os indicadores ecológicos e ecotoxicológicos são bons, há uma confiança maior em concluir que o ecossistema é saudável. Por outro lado, quando ambos os indicadores apontam para alterações em indivíduos e populações, também pode-se chegar à conclusão sobre o grau de impacto ou péssima qualidade do sistema (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003). A Tabela 1 exemplifica um diagnóstico de qualidade do ecossistema baseado em biomarcadores e investigações ecológicas.

Tabela 1. Diagnóstico de qualidade do ecossistema baseado em biomarcadores e investigações ecológicas.

Biomarcadores	Populações	Ecossistemas
++	++	Boa qualidade
--	--	Péssima qualidade
+/-		
Compensação	++	Frágil, instável
-/+		
Degradação		
++	--	Condição ecológica desfavorável

(Modificado de Vasseur; Cossu-leguille, 2003).

2.4 BIOMARCADORES

2.4.1 Índices morfométricos

As características da história de vida, crescimento corpóreo e maturidade sexual auxiliam na identificação de espécies que são mais ou menos resistentes aos efeitos de impactos antrópicos e características físicas e biológicas do *habitat*. Alterações na estrutura das populações pode ser um indicativo inicial de declínio populacional e um parâmetro importante em biomonitoramento para identificar risco ao status futuro das populações (STEEN; GIBBS, 2004).

A proporção sexual é utilizada para demonstrar, por vezes, um desequilíbrio entre o número de machos e fêmeas. Para essa proporção, o esperado é que ela se mantenha mais próxima de 1:1 (NIKOLSKY, 1969) o que indica que as condições dos ambientes se encontram

adequadas para o desenvolvimento proporcional entre os sexos. Variações nessa proporção podem estar associadas a diferentes fatores como a mortalidade, crescimento e comportamento. No inverno a proporção geralmente se mantém mais próxima de 1:1 (FONTOURA et al., 1993; ABILHOA, 2007; SILVA et al., 2012), no entanto nesse período a produtividade do sistema pode diminuir e conseqüentemente a quantidade de alimento. Em rios oligotróficos a tendência é o predomínio de machos e quando o alimento é abundante o predomínio é de fêmeas (NIKOLSKII, 1969). Este parâmetro também pode refletir o estado nutricional dos ambientes, dessa forma este fator torna-se relevante em estudos de toxicologia pois, se a disponibilidade do alimento diminui, um comprometimento adicional do estado de saúde geral do peixe pode ocorrer em condições estressantes, como a baixa qualidade da água, temperatura elevada, diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (OD) e presença de contaminantes.

Medidas de saúde e condição geral em peixes são frequentemente utilizadas como biomarcadores de efeito. O crescimento e fator de condição podem refletir qualidade relativa do *habitat* para além de sua finalidade comum, como medidas de reprodução e desenvolvimento (PHELAN et al., 2000; FONSECA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2009). O potencial biomarcador destes índices está justamente no fato de que eles integram a variabilidade ambiental e permitem uma avaliação da saúde dos peixes em um determinado *habitat*, considerando que o peixe responde às variáveis bióticas e abióticas, qualidade e disponibilidade de alimentos bem como a poluição (FONSECA, 2010).

Respostas a restrições ecológicas são complexas e dependem de intrincadas relações entre as condições ambientais e a capacidade individual dos organismos se adaptarem. Os peixes exibem várias adaptações ou estratégias que resultam na alternância entre o crescimento, reprodução e sobrevivência (ARENDETT, 1997). Os índices somáticos permitem definir ciclos reprodutivos (GUTIÉRREZ-ESTRADA et al., 2000) e possíveis variações na condição fisiológica das espécies durante o curso de sua vida útil (KREINER et al., 2001; BRAGA, 2005). Além disso, o tamanho de órgãos é uma medida de relevância que pode indicar efeitos adversos, onde os mecanismos tóxicos não são completamente compreendidos em resultado de exposição a xenobióticos, e/ou em parte, como uma variável de suporte para biomarcadores conduzidos no indivíduo, tecido, células e níveis subcelulares (BALK et al., 2012).

Uma das medidas mais importantes é o desenvolvimento das gônadas. O Índice Gonadossomático (IGS) é expresso pelo tamanho das gônadas em relação ao peso corporal somático (WOOTTON, 1991). Os melhores biomodelos para esta variável são as espécies em que as gônadas dos juvenis e dos peixes imaturos diferem de adultos e onde há diferenças distintas nos sexos (BALK et al., 2012). O processo reprodutivo constitui um dos sinais de

saúde mais essencial a nível individual. Quando o mecanismo de reprodução falha ou é prejudicado, há um risco óbvio para efeito adverso tanto geneticamente como para a sobrevivência do indivíduo e consequentemente para população. Dessa forma, a diminuição do tamanho das gônadas, de um ou de ambos os sexos, indica um risco evidente para a redução do potencial reprodutivo (BALK et al., 2012).

A literatura vem mostrando que este índice pode ser influenciado por contaminantes em diferentes estudos de campo em ambientes poluídos (McMASTER et al., 1991; FÖRLIN et al., 1995; NOAKSSON et al., 2001). Em laboratório, o efeito sobre o IGS foi relatado em peixes expostos a frações de petróleo (TRUSCOTT et al., 1983; KICENIUK; KHAN, 1987), HPAs (SINGH, 1989; THOMAS; BUDIANTARA, 1995), PCBs (THOMAS, 1988), agrotóxicos (RAM; SATHYANESAN, 1986; SINGH, 1989) e metais (SINGH, 1989; PEREIRA et al., 1993).

A utilização do IGS deve seguir alguns critérios para aumentar a sua eficácia como biomarcador. Em determinadas épocas do ano o desenvolvimento das gônadas é muito rápido e valores diferentes podem ser obtidos dentro de um período de apenas alguns dias ou semanas. Orienta-se que a análise nesses períodos deva ser evitada (FORLIN; HAUX, 1990; LARSEN et al., 1992). Além disso uma interrupção completa da maturação sexual reflete uma situação extrema e valores muito baixos (BALK et al., 2011).

Analogamente à análise do tamanho da gônada é o tamanho relativo do fígado pelo peso corporal (Índice Hepatossomático). Este índice fornece uma indicação sobre o estado de reserva de energia em um animal e também como uma variável de suporte para outros biomarcadores em níveis tecidual e molecular. Em um ambiente pobre, peixes costumam ter um fígado menor (com menos energia reservada no órgão). Esta medida é utilizada como um índice bruto de avaliação ambiental em alguns trabalhos (Van der OOST et al., 2003; GHISI, 2012; de Andrade BRITO et al., 2012). Mesmo diante da baixa sensibilidade o que depende do nível de contaminação (Van der OOST et al., 2003), este índice se correlaciona com o aumento da capacidade para metabolizar xenobióticos (YANG et al., 2004), mudanças sazonais, estado nutricional, infecções por parasitas e doenças hepáticas (HEATH, 1995). Determinados grupos de contaminantes são responsáveis por aumentar o tamanho do fígado em várias espécies de peixes, como os HPAs e organoclorados (ÅKERBLOM et al., 2000; STEPHENSEN et al., 2000), pesticidas e metais (SINGH, 1989; ÅKERMAN et al., 2003). Portanto, o IGS pode ser empregado em biomonitoramento ambiental (Van der OOST et al., 2003).

Em ambientes onde as condições foram severamente alteradas pela poluição esta métrica é amplamente afetada, neste caso a sua interpretação irá depender de outras variáveis

biológicas. O índice também difere em estudos conduzidos em ambientes com diferentes níveis de impacto, o que reforça a necessidade de sua utilização em conjunto com outras métricas no biomonitoramento. Por exemplo, foram relatados valores de IHS elevados tanto em situação de estresse (KLOEPPER-SAMS; OWENS, 1993; HUUSKONEN; LINDSTROM-SEPPA, 1995; FORLIN et al., 1995) bem como em ambientes preservados (LIEBEL et al., 2013), além disso a diminuição deste índice também foi associada a locais impactados (FORLIN et al., 1995; KOSMALA et al., 1998; NOAKSSON et al., 2001). No inverno, quando a temperatura é mais baixa e a produtividade do sistema decai, valores de IHS também podem diminuir (GHISI et al., 2012).

O fator de condição (K) é outro índice comumente utilizado no estudo da biologia dos peixes, com base no pressuposto de que os indivíduos de um dado comprimento de corpo estão em melhor condição quando a sua massa é maior (JONES et al., 1999; ANENE, 2005). O valor de K reflete o estado nutricional de um indivíduo e o padrão de crescimento. Em conjunto com os parâmetros de reprodução este fator desempenha o papel de indicador de estado de saúde geral do organismo ao longo do tempo. O crescimento baixo significa que menos energia está disponível para a reprodução, que por sua vez pode reduzir a aptidão da espécie e levar a uma diminuição da população (ANENE, 2005).

2.4.2 Biomarcadores histológicos

Os biomarcadores histológicos representam um nível intermediário de organização biológica (entre os níveis moleculares e individuais) e são ferramentas úteis para integrar os efeitos cumulativos de alterações bioquímicas e fisiológicas (MYERS; FOURNIE, 2002). As mudanças em nível de tecido constituem bons biomarcadores de efeito. O conjunto das análises químicas e histológicas fornecem dados importantes para identificar e avaliar o impacto dos contaminantes presentes em ecossistemas aquáticos, além do grau de poluição ambiental (Van der OOST et al., 2003).

A histologia fornece um método rápido para detectar os efeitos de substâncias irritantes, especialmente as crônicas, em vários órgãos e tecidos. As alterações histológicas aparecem como uma resposta a médio prazo aos estressores sub-letais. A exposição de peixes a contaminantes químicos pode induzir lesões em diferentes órgãos, como as brânquias, rim, fígado e pele, por isso são adequados a histologia e constituem marcadores primários para a poluição aquática (BERNET, 1999).

A ação tóxica de poluentes sobre diferentes órgão e tecidos irá depender de alguns fatores relacionados as características físicas e químicas do ambiente e podem afetar com mais intensidade determinados órgãos, que podem responder de forma diferenciada a variados tipos de contaminantes e estressores ambientais. Por exemplo, o fígado é um órgão que pode acumular danos devido aos processos de biotransformação, que ocorrem preferencialmente neste órgão (BRUSLE et al., 1996; JIN et al., 2010; PAULINO et al., 2014). As brânquias podem sofrer mais danos sob exposição tóxica aguda (SPIES et al., 1996; Van der OOST et al., 2003) e apresentar menor quantidade de lesões do que o fígado e outros órgãos quando expostos à menores quantidades de determinados agentes tóxicos (PAULINO et al., 2012).

Estas diferenças ocorrem porque a difusão dos compostos orgânicos de herbicidas e pesticidas através das membranas biológicas depende da sua solubilidade lipídica e algumas restrições físicas e químicas podem limitar a absorção (MCKIM; ERICKSON, 1991). Por outro lado, a membrana lipídica é uma barreira para os íons orgânicos e inorgânicos; a difusão de íons livres, tais como os metais da água para as brânquias depende da sua especiação, que é influenciada pelo pH e outros fatores químicos da água e, geralmente, ocorre através dos canais iônicos na membrana celular e/ou junções celulares (TAO et al., 2001). Compostos e metais que se ligam a proteínas e lipídios afetam o gradiente de difusão através do epitélio branquial, e são transportados através do sangue principalmente para o fígado (MCKIM; ERICKSON, 1991). Portanto, a bioacumulação e biotransformação de organoclorados e metais são processos órgãos-específicos, ou seja, brânquias, fígado e demais órgãos dependem de uma combinação de fatores físicos e químicos e da capacidade das células para metabolizar e eliminar estes compostos, que se traduzem em alterações e lesões, que são detectadas por estudos histopatológicos (SAKURAGUI et al., 2013).

Para avaliar as respostas teciduais um fator de importância patológica foi estabelecido por Bernet (1999). Esse fator considera reações padronizadas de acordo com as unidades funcionais do órgão (epiderme e derme) ou o órgão inteiro. As reações são relativas a função do órgão e a habilidade de sobrevivência do peixe que podem ser afetados em condições adversas. Considera-se também a prevalência e o nível (ou extensão e gravidade), que geralmente estão associados ao tempo de exposição e concentração de xenobióticos. Cada padrão apresenta um grau de severidade, considerando a possibilidade de reversão ou progressão, perda da função e distúrbios transitórios (BERNET, 1999; Van der OOST et al., 2003).

Os padrões de reação de acordo com Bernet (1999) são:

1. distúrbios circulatórios, que resultam de uma condição patológica de vasos e do tecido sanguíneo. Inclui: extravasamento de fluídos, processos inflamatórios, hemorragias e hiperemia/aneurisma;

2. mudanças regressivas: processos que terminam na redução ou a perda funcional do órgão. Estes envolvem atrofia, degeneração (malformação ou disfunção de estruturas celulares, como resultado de danos celulares), necrose, depósitos (acúmulos de substâncias intercelulares causados principalmente por processos degenerativos), alterações nucleares e atrofia (redução no número e volume de células e/ou uma redução do volume de substâncias intercelulares);

3. alterações progressistas: processos que levam ao aumento da atividade de células ou tecidos: hipertrofia associada a inflamação, ampliação do volume celular ou do tecido (não em quantidade) e hiperplasia: aumento do tecido ou órgão por aumentar número de células sem alteração no volume do padrão celular.

4. processos inflamatórios: frequentemente associadas aos processos pertencentes a outros padrões de reação, não ficam classificadas somente em um, pois muitas vezes torna-se difícil atribuir alterações inflamatórias a um único padrão. Inclui exsudatos: fluidos que contém uma elevada concentração de proteínas e uma grande quantidade de restos celulares de sangue e da linfa; ativação do sistema retículo endotelial (RES): hipertrofia do RES, que consiste em células e macrófagos endoteliais que revestem pequenos vasos; sangue: leucócitos penetrando as paredes sanguíneas e infiltrando o tecido circundante.

5. neoplasias subdivididas em tumores benignos e malignos.

As lesões e alterações observadas no fígado geralmente estão associados a exposição a contaminantes e ao parasitismo, geralmente ocorrem associadas (presença de uma ou mais) e podem ser resultantes de pró-oxidantes e de processos inflamatórios. Por exemplo, a necrose está fortemente associada ao estresse oxidativo provavelmente instaurado pela lipoperoxidação das membranas (LPO). A LPO é uma fonte importante de espécies oxidativas em situações de exposição a poluentes e dependendo da extensão pode provocar o rompimento das membranas (AVCI et al., 2005; HINTON et al., 2008; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). A morte por necrose não é um processo natural em células saudáveis, nas quais a remoção celular dos tecidos se dá por apoptose (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995), mas trata-se de uma morte ocasionada por lesão aguda, onde as células tipicamente incham e arrebentam, extravasando seu conteúdo e provocando a resposta inflamatória potencialmente prejudicial (ALBERTS al., 1997).

A presença de parasitas, bem como da necrose, acionam uma resposta imunológica inicial, com o objetivo de neutralizar, destruir e remover os agentes agressores e induzir a recuperação do tecido danificado (BERNET et al., 1999). Nesse caso, por vezes associado, pode

ocorrer a presença melanomacrófagos livres e de centro de melanomacrófagos. Estes desempenham um papel importante no sequestro dos produtos de degradação celular e de metabólitos potencialmente tóxicos, tais como os radicais livres e produtos de degradação catabólica (AGIUS; ROBERTS, 2003).

As brânquias, bem como a pele, representam também marcadores primários para a poluição aquática. Em contato direto e permanente com potenciais estressores, devido à grande área de superfície, podem apresentar mudanças antes que efeitos sejam observados em outros órgãos. Por terem células mucosas e, portanto, produzirem muco, desempenham um papel importante na resistência a doenças contra patógenos e substâncias tóxicas, além de outras funções (SHEPHARD, 1994).

Os danos mais frequentemente encontrados nas brânquias e resultantes de exposição tóxica, são a hipertrofia e hiperplasia das lamelas primárias e secundárias. Quando na exposição contínua, estas alterações podem evoluir para quadros mais severos, como uma fusão parcial ou completa de várias lamelas, reduzindo a área de superfície respiratória e o espaço interlamelar através do qual a água flui ao longo do ciclo respiratório (Van der OOST, 2003).

Isto pode ocorrer como consequência de processos inflamatórios ou um aumento da permeabilidade no sistema de células pilar, o que aumenta a distância de difusão entre o sangue e a água. Todas essas mudanças são respostas de defesa que ajudam a evitar a absorção de contaminantes da água (MALLAT, 1985; CERQUEIRA; FERNANDES, 2002), mas prejudicando a difusão dos gases (LAURENTE; PERRY, 1991). Estas alterações têm como finalidade proteger o indivíduo de uma situação de estresse e/ou conservar a homeostasia do animal (MALLAT, 1985) e são reversíveis quando a quantidade de estressores diminui ou a exposição é interrompida (BERNET, 1999).

Outra alteração importante é a aneurisma, que pode surgir pela ação direta dos contaminantes na adesão de células pilar, alterações na pressão dos vasos sanguíneos aferentes/eferentes ou devido a necrose das células pilar. Embora seja reversível, pode evoluir sob a exposição crônica e resultar em ruptura epitelial e hemorragias além de contribuir para a diminuição das taxas de difusão de gases (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

A fragilidade do tecido e o desprendimento de células epiteliais também são alterações relevantes que podem ocorrer devido a ação de poluentes sobre o tecido, levando a perda de aderência entre as células (ARAÚJO, 2009). O descolamento do epitélio respiratório também resulta no aumento da distância de difusão, o que afeta as trocas gasosas (NOWAK, 1992). Esta alteração também pode surgir como mecanismo de defesa para diminuir a área de superfície

vulnerável da brânquia ou aumentar a barreira de difusão do poluente (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000).

2.4.3 Danos oxidativos e atividade antioxidante

O uso de agrotóxicos organoclorados, nas últimas décadas, tem promovido o acúmulo de resíduos tóxicos em vários ecossistemas, sendo que os aquáticos são os mais atingidos devido ao aporte direto e indireto via processos atmosféricos e hidrológicos (LEMOS; TERRA, 2003). A retenção de contaminantes no sedimento, em particular de compostos mais lipofílicos, como os agroquímicos, contribui para a contaminação dos ambientes em longo prazo (BROWN et al., 2000; FLEEGER et al., 2003).

Os efeitos tóxicos em organismos aquáticos dependem de complexas interações químicas e físicas entre o estressor, o meio e o organismo. A água acaba atuando como um reator de diferentes misturas de poluentes, e nessas condições os organismos encontram-se mais vulneráveis e suscetíveis a uma maior exposição. Por exemplo, organoclorados e metais, advindos de fontes agrícolas e industriais, podem ter efeitos tóxicos potencializados no meio hídrico, e nesse caso as respostas se manifestam em diferentes órgãos e tecidos, e inclui disfunções fisiológicas, alterações estruturais e modificações comportamentais. O conjunto destes efeitos resultam no prejuízo do crescimento e reprodução dos indivíduos (ADAMS, 1990).

Compostos organoclorados apresentam alta resistência à degradação química e biológica e se acumulam ao longo de cadeias alimentares (TORRES, 1998). Algumas classes de organoclorados são consideradas altamente cancerígenas (PERSIC, 2004). A lipofilicidade destas substâncias permite que elas atravessem facilmente as membranas celulares, se ligando a receptores e conseqüentemente alterando a duração e a amplitude do metabolismo celular. Elas também se acumulam em tecidos adiposos, onde podem ser encontradas em concentrações maiores do que as observadas no ambiente (BISHAYI; SENGUPTA, 2003).

Outro grupo importante de contaminantes são os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). A presença de HPAs no ambiente está associada a ocorrência de tumores e disfunção imune (EISLER, 1987; REYNAUD; DESCHAUX, 2006). Os HPAs também se concentram no sedimento onde se associam com a matéria orgânica em suspensão, podendo ser absorvidos pelos organismos por via trófica e por contato direto (NETTO et al., 2002). Uma vez dentro do organismo, são metabolizados principalmente pelo fígado e seus metabólitos

podem ser secretados com a bile para a vesícula biliar, onde ficam armazenados até a bile ser lançada no trato intestinal (AAS et al., 2000; RUDDOCK et al., 2003).

A determinação de HPAs na bile é um excelente biomarcador de exposição (Van der OOST et al., 2003), de relativa especificidade devido ao peso molar (quantidade de anéis) corresponder a sua origem. Os HPAs de origem pirogênica, ou seja, derivado da queima de material orgânico, tendem a apresentar uma maior frequência para os compostos com 4 a 6 anéis (fluoranteno, pireno, benzo (b, k) fluorantenos e benzo (g, h, i) perileno) (PAVEI, 2007; MENICONI, 2007), do que aqueles de origem petrogênica, que estão mais relacionados com a atividade de extração ou processamento de petróleo constituídos predominantemente por 2 e 3 anéis aromáticos (naftaleno, fluoreno e fenantreno) (IKENAKA et al., 2005; MEIRE et al., 2007). Os HPAs mais leves, de dois a quatro anéis, devido a rápida degradação, perduram por menos tempo no ambiente e depositam-se nas camadas mais profundas do sedimento. Já os mais pesados, de cinco a seis anéis, que incluem os compostos mais carcinogênicos, demoram mais tempo para serem degradados e se depositam nas camadas mais superficiais do sedimento (KODO FILHO, 2006).

Os efeitos genotóxicos são um dos mais importantes atribuídos a estes compostos. Os HPAs que contêm regiões denominadas “baías”, geralmente HPAs de três a cinco anéis como o benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno e fenantreno, favorecem uma sequência de reações que é finalizada pela ligação do hidróxi-HPA formado após metabolização com uma base nitrogenada do DNA. Os metabólitos epóxidos resultantes dessas reações, espécies carcinogênicas, podem formar um cátion estável por adição de H⁺, capaz de unir-se ao DNA, reagir com a guanina formando então o aduto (BAIRD, 2002).

A ação tóxica em sistemas biológicos de HPAs, compostos de agrotóxicos, metais e outros, basicamente inicia-se por uma interferência nos sistemas enzimáticos de defesa antioxidante, provocada pelo aumento excessivo na produção de ERO (KLEIN et al., 1991). Quantidades elevadas de ERO podem diminuir o potencial antioxidante, nesse caso um estresse oxidativo é instaurado. A consequência é um ciclo de degradação oxidante que se inicia pelos lipídios de membranas e proteínas chegando até as moléculas do DNA (KUCHINO et al., 1987).

A peroxidação lipídica leva a desintegração das membranas biológicas e gera os peróxidos lipídicos. Estes por sua vez, possuem poder de ação oxidante maior do que as outras espécies tóxicas primárias de O₂ (O₂^{•-}, H₂O₂, OH[•], O₂), atingindo facilmente alvos mais distantes. Os hidroperóxidos resultantes da peroxidação são instáveis e se decompõem em misturas complexas de aldeídos, cetonas, alcanos e ácidos carboxílicos, os quais são tóxicos

mutagênicos ativos (ESTERBAUER et al., 1990; PORTER et al., 1995; D'ISCHIA et al., 1996) e podem formar adutos com o DNA (MARNETT, 1999). Os efeitos cumulativos da lipoperoxidação foram implicados como mecanismos subjacentes em numerosos estados patológicos em animais (STEINBERG, 1997).

As proteínas são, possivelmente, o veículo mais imediato para o dano oxidativo nas células, pois muitas vezes são catalisadoras em vez de mediadores. O uso de grupos carbonilas nas proteínas como biomarcadores do EO tem algumas vantagens em comparação com a medição de outros produtos de oxidação, devido à rápida formação e estabilidade relativa das proteínas carboniladas (DALLE-DONNE et al., 2003). A oxidação de proteínas pode levar à perda de grupos sulfidrilas essenciais e à modificação de aminoácidos que conduzem à formação de carbonila e de outras porções oxidadas (STERN, 1985). O radical $\text{OH}\cdot$, altamente reativo, é considerado como sendo um dos principais responsáveis pela formação de grupos carbonilas nas proteínas (FARBER; LEVINE, 1986). A degradação proteolítica por oxidação pode afetar a estrutura, função e integridade de membras e componentes celulares (DAVIES, 1987; CARNEY et al., 1991).

A atividade dos sistemas antioxidantes biológicos são biomarcadores amplamente utilizados em toxicologia ambiental devido a sensibilidade elevada à toxicidade de agentes estressores mesmo quando em baixas concentrações (AKAISHI, 2003). Eles também podem fornecer respostas sobre a biodisponibilidade de poluentes e elucidação sobre as relações de causa e dose-efeito. Em geral, as respostas dos biomarcadores são consideradas como sendo intermediárias entre as fontes poluentes e efeitos em nível superior (Van der OOST et al., 2003). Os efeitos biológicos de poluentes ambientais são rotineiramente avaliados por meio de vários marcadores moleculares e bioquímicos refletindo a indução de sistemas de biotransformação específicos ou o surgimento de várias alterações celulares (VIARENGO et al., 2007)

As reações envolvidas no metabolismo ou biotransformação de xenobióticos incluem duas fases. A primeira delas (fase I), frequentemente oxidativa, ocorre quando um grupamento funcional polar (exemplo OH) é adicionado ao contaminante lipofílico, na tentativa de torná-lo mais hidrofílico. A fase II consiste em conjugar os metabólitos produzidos na fase I a compostos endógenos, de ocorrência comum nas células, gerando um metabólito secundário. A conversão de compostos lipofílicos em outros mais hidrofílicos é essencial nesta etapa da detoxificação pois permite que eles se tornem excretáveis. Porém, alguns metabólitos produzidos na fase I podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (DI GIULIO et al., 1995; LANDIS et al., 1995; Van der OOST et al., 2003).

A maioria dos poluentes e os seus metabólitos induzem a toxicidade por meio do estresse oxidativo (EO) resultante da produção excessiva de ERO durante o metabolismo de biotransformação nos tecidos (LUSHCHAK, 2011). O Estresse oxidativo é o processo instaurado quando ocorre um desequilíbrio entre a geração e a neutralização de ERO por mecanismos antioxidantes (DAVIES, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; CUI et al., 2004). O nível de EO pode variar ao longo do tempo e os organismos são capazes de adaptar-se por induzir a síntese de enzimas antioxidantes adicionais para regular o dano oxidativo (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Metais de transição, quinonas, corantes, herbicidas bupiridílios e compostos aromáticos nitrados são conhecidos por serem potencialmente causadores de EO (KAPPUS; SIES, 1981).

As enzimas de defesa antioxidante envolvidas na remoção de ERO são as principais candidatas a biomarcadores do EO e a catalase (CAT) é uma delas. A CAT é uma das principais enzimas do complexo II em organismos superiores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O aumento da atividade específica da CAT tem sido relatado como indicador de EO e sugere uma defesa do organismo na tentativa de eliminar ERO (Van der OOST et al., 2003). Esta enzima é responsável pela dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NORDBERG; ARNÉR, 2001), e acredita-se que o aumento da concentração desse radical pode levar ao aumento da atividade da CAT. O H_2O_2 possui elevada permeabilidade à diversas membranas biológicas e pode inativar enzimas (Van der OOST et al., 2003). O seu excesso compromete direta e indiretamente a integridade de moléculas localizadas em diferentes sítios dentro das células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989), causa oxidação de hemoglobinas e, conseqüentemente diminuição das concentrações de oxigênio, desencadeando infecções e necrose (WIEACKER et al., 1980). Além disso, o H_2O_2 pode reagir para formação de radical hidroxila ($HO\cdot$) e de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (STADTMAN; LEVINE, 2000; JACKSON; LOEB, 2001), que são espécies de ERO altamente reativas e podem provocar danos a diferentes estruturas celulares, além de contribuir para a formação de EO.

A glutathione-S-transferase (GST) é uma família de enzimas multifuncionais relacionadas a conjugação e excreção de compostos tóxicos da fase II. O fígado é sua principal fonte. As GSTs também participam do processo de detoxificação de contaminantes lipofílicos, por ativar as reações de conjugação com substratos endógenos, como o GHS. O resultado é o aumento da solubilidade dos xenobióticos na água e na taxa de eliminação, reduzindo a probabilidade destes se ligarem a macromoléculas celulares como o DNA. A toxicidade de muitos xenobióticos pode ser modulada pela indução de GSTs (Van der OOST et al., 2003).

A GSH desempenha um papel importante nas reações de detoxificação por conjugação com intermediários eletrofílicos sob a ação catalítica de enzimas antioxidantes. Geralmente esta enzima é a primeira linha de defesa contra o EO e atua como um importante antioxidante para remoção de ERO por meio da oxidação de GSH a GSSG (glutathiona oxidada) (ZHANG et al., 2004). A conjugação da glutathiona com os xenobióticos, quer seja espontânea, ou catalizada pela GST, pode diminuir a ação dos xenobióticos e tornar essas moléculas mais solúveis na água, podendo ser mais facilmente eliminadas (BOYLAND; CHASSEAUD, 1969).

A diminuição da concentração de GSH é muitas vezes associada a danos oxidativos às macromoléculas celulares, como os lipídios e proteínas. Os lipídios são, muitas vezes, mais sensíveis a danos oxidativos moderados do que as proteínas (FILIPAK NETO, 2007). Os efeitos deletérios de ERO incluem a peroxidação de lipídios insaturados nas membranas celulares. Este processo conduz a hidroperóxidos lipídicos instáveis, produtos de decomposição que são altamente reativos e ameaçam a integridade celular. Além disso, estes produtos podem decompor-se em radicais livres e perpetuar o ciclo destrutivo de reações em cadeia de lipídios peroxidados. Os níveis de ERO, oxidação de proteínas e lipídios também são importantes marcadores de estresse oxidativo, e por isso são um dos indicadores mais expressivos de poluição em ecossistemas aquáticos (Van der OOST et al., 1994, COSSU et al., 1997; YANG; RANDALL, 1997).

Danos em estruturas neurais de peixes resultam em prejuízos diretos e limitantes a sua capacidade de sobrevivência (NASCIMENTO et al., 2006), dessa forma a neurotoxicidade constitui outro importante biomarcador de exposição e efeito, que pode se refletir no aumento ou redução da atividade da Acetilcolinesterase (AChE). A AChE está envolvida na desativação da acetilcolina nas terminações nervosas, e é vital para o funcionamento normal dos sistemas sensoriais e neuromusculares (MURPHY, 1986). Alterações na quantidade desta enzima pode resultar no comprometimento da capacidade natatória dos organismos aquáticos e outras funções neurológicas essenciais para a sobrevivência (BEAUVAIS et al., 2000). A AChE é encontrada principalmente na lâmina basal de sinapses e junções neuromusculares, é responsável pelo término dos impulsos colinérgicos por meio da hidrólise da acetilcolina a colina e ácido acético (METCALF, 1971; O'BRIEN, 1976) e executa um papel vital em muitas funções fisiológicas em organismos aquáticos, tais como fuga de predadores, localização da presa, e orientação com relação aos alimentos.

2.4.4 Biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade

O teste do micronúcleo (MN), originalmente desenvolvido com espécies de mamíferos (HEDDLE et al., 1983), é hoje amplamente aplicado com êxito em peixes e outros organismos aquáticos para identificar alterações genômicas causadas por agentes xenobióticos e misturas ambientais complexas. Este ensaio tem como alvo células em interfase e, devido à sua potencialidade, pode ser aplicado em qualquer população de células que estão proliferando independentemente do cariótipo da espécie (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

O MN tem sido amplamente utilizado para detectar compostos clastogênicos e aneugênicos em ecossistemas aquáticos (CARRASCO et al., 1990; FENECH, 2000; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). A presença desse tipo de dano é um indicativo de lesões cromossômicas e instabilidade genômica (IARMARCOVAI et al., 2008).

As alterações morfológicas nucleares (AMN), que ocorrem devido a anormalidades durante a segregação de cromátides no processo de divisão celular (SHIMIZU et al., 1998), também são biomarcadores para genotoxicidade e citotoxicidade (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA 2001; FENECH; CROTT, 2002; CAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Ainda que seu mecanismo de formação não esteja totalmente elucidado, vem sendo demonstrado uma relação direta entre a indução de MN e um aumento do nível de AMN após a exposição a diferentes compostos tóxicos (AYLLÓN; GARCIA-VASQUEZ, 2001; ERGENE et al., 2007).

Efeitos mutagênicos e genotóxicos indicam a ocorrência de perda de cromatina, como resultado de dano a qualquer estrutura dos cromossomos (fragmentação) ou no aparelho mitótico (BOMBAIL et al., 2001; GRISOLIA; STARLING, 2001). Um aumento na taxa de mutação pode resultar na diminuição do potencial adaptativo, com a consequente eliminação de genótipos susceptíveis, o que, a longo prazo, implicaria na redução da biodiversidade (GRISOLIA, 2005; UDROIU, 2006).

Aparentemente, a ação de qualquer agente químico genotóxico pode originar aumento na frequência de MN e AMN. Estudos laboratoriais mostram os efeitos de uma variedade de contaminantes como inseticida, organofosforados, compostos piretróides e HPAs sobre os organismos aquáticos expressos pelo teste do MN (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001; VEIGA et al., 2006; GLUSCZAK et al., 2007; MORAES et al., 2007; REIS-HENRIQUES et al., 2009; COSTA et al., 2011). Em ambientes naturais impactados também foram verificadas

a ocorrência de MN e AMN em diferentes espécies (ERGENE et al., 2007; SALVAGNI et al., 2011).

O ensaio cometa, ou “Single Cell Gel Electrophoresis”, tem sido aplicado como um biomarcador não-específico, sensível, rápido e econômico para a detecção de danos genéticos. Este ensaio vem sendo utilizado com sucesso nos últimos anos em uma variedade de grupos filogeneticamente distintos de organismos incluindo peixes e mamíferos (JHA, 2008).

A versão alcalina do ensaio permite detectar, em células individualizadas, quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis (SINGH, 1988; TICE, 2000). Este ensaio combina a simplicidade de técnicas bioquímicas e apresenta algumas vantagens sobre outros testes citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão (COLLINS, 2004). Além disso, tem proporcionado a oportunidade de estudar o dano ao DNA, reparo e morte celular (morte celular programada, incluindo apoptose) em diferentes tipos celulares em espécies nativas, sem o conhecimento prévio do cariótipo e taxa de renovação celular (DIXON et al., 2002; JHA, 2004).

Para detectar danos com o ensaio cometa não são necessárias informações relativas ao ciclo celular, o que elimina o problema encontrado pelo teste MN, onde a indução é um fenômeno dependente do ciclo (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Portanto, o uso combinado desses dois testes pode aumentar a compreensão do potencial genotóxico de poluentes aquáticos (KLOBUCAR et al., 2006). Resultados da literatura mostram que correlações positivas são, geralmente, encontradas entre os resultados obtidos pelo MN e pelo ensaio cometa em células de peixes e de outras espécies aquáticas sob condições em *in vitro* e *in vivo* (JHA, 2008).

2.5 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS QUE ATUAM COMO FATORES LIMITANTES

Comunidades de ecossistemas aquáticos são submetidas constantemente a mudanças nas condições hidrodinâmicas e limnológicas (MATTHEWS, 1998), principalmente em função da pluviosidade e de fatores abióticos associados (PERES NETO et al., 1995; BIZERRIL, 1997). Estas mudanças podem atuar como fatores limitantes e são capazes de provocar respostas adaptativas nos organismos.

Em peixes, mudanças estacionais decorrentes da expansão e contração do ambiente aquático durante as variações climáticas podem influenciar a alimentação, reprodução e

tamanho das populações fato que lhes confere complexidade no estudo e consequente conservação (ABILHOA, 2007).

A dinâmica dos processos químicos da água é influenciada diretamente pela temperatura, pH, OD e quantidade de matéria orgânica e por sua vez interfere na manutenção fisiológica dos peixes. Por exemplo, a maior parte dos organismos aquáticos têm sua temperatura regulada pelo meio externo. Nesses organismos, a velocidade das reações metabólicas depende da temperatura da água (PORTO et al., 1991). Ela também influencia na solubilidade dos gases, que tende a diminuir com sua elevação. A radiação solar provoca o aquecimento de corpos hídricos e com isso a concentrações de OD pode ser reduzida sobretudo em corpos hídricos que perderam sua cobertura vegetal (MAIER, 1987).

A velocidade e turbulência reduzida em períodos de estiagem também tendem a diminuir a transferência do oxigênio atmosférico para a água por processo de difusão. Outro fator, a decomposição da matéria orgânica pelas bactérias aeróbias, é acompanhada pelo consumo do oxigênio dissolvido e, dependendo da capacidade de autodepuração do manancial o teor de OD pode alcançar valores muito baixos (STEHFEST, 1973; VASCONCELLOS, 2011). As concentrações reduzidas de OD é um fator estressante para os organismos, mesmo em situações em que há oscilação da quantidade de O₂. Por exemplo, foi demonstrado que a hipóxia é capaz de gerar EO momentâneo e a reintrodução do O₂ nos tecidos contribui para a formação de mais ERRO (NEGREIROS et al., 2011).

As alterações associadas a eventos de hipóxia são semelhantes às observadas em resposta a substâncias tóxicas e/ou aditivas. Elevadas perdas da integridade do DNA foram relatadas em condições de hipóxia (1,5mg O₂/L) em *Hippocampus reidi*, nos quais os níveis de danos não diferiram da condição de hipóxia+frações de petróleo bruto. Um aumento no número de micronúcleos e alterações histopatológicas também foram verificadas nestes mesmos peixes (NEGREIROS et al., 2011). De acordo com os autores, os mecanismos que geram estes danos ainda não foram totalmente elucidados, porém sabe-se que a combinação: contaminantes e baixa concentração de O₂ compromete adicionalmente a saúde dos organismos aquáticos. Por exemplo, mudanças nas brânquias em resposta a presença de contaminantes, ocorrem na tentativa de aumentar a barreira entre a água e o sangue para evitar absorção dos compostos tóxicos, no entanto prejudica a difusão de gases que pode ser agravado em ambientes anóxicos (MUSTAFA et al., 2011).

Foi observado em peixes que normalmente são tolerantes a condições de baixa concentração de OD, níveis aumentados de expressão de genes de reparação do DNA (XRCC1 e OGG1) como resultado de exposição a condições de severa hipóxia (1,8 mg/L) por 21 dias e

após recuperação da normóxia por sete dias. Além disso, danos mensurados pelo ensaio cometa foram significativamente maiores nos peixes em condição de hipóxia comparativamente aos outros grupos, alterações histológicas e a lipoperoxidação também estavam aumentados em relação aos controles negativos (MUSTAFA et al., 2014).

O pH da maioria dos corpos de água varia entre 6 e 8. A acidez nos corpos hídricos pode estar relacionada à inúmeros fatores (ESTEVES, 1998). Em geral, em ambientes naturais o pH é alterado pelas concentrações de íons H^+ originados da dissociação do ácido carbônico, que gera valores baixos de pH e das reações de íons de carbonato e bicarbonato com a molécula de água, que elevam os valores de pH para a faixa alcalina (ESTEVES, 1998). A oxidação da matéria orgânica, devido ao aumento da concentração de nutrientes na água, pode reduzir os níveis de OD (ARAÚJO et al., 2007) em consequência do aumento da respiração, também pode causar a redução nos valores de pH. Os organismos normalmente possuem uma faixa de tolerância a estas variações, porém a acidificação dos ambientes pode causar lesões em órgãos vulneráveis, como a pele e as brânquias, além de afetar a taxa de crescimento dos microrganismos aquáticos (VASCONCELLOS, 1999) diminuindo com isso a produtividade do sistema e os recursos alimentares para níveis tróficos superiores.

Os fatores que modulam o aumento ou diminuição da carga de nutrientes podem variar de acordo com as características naturais dos ambientes e estão relacionados aos aspectos climáticos e intervenções antrópicas. O nitrogênio orgânico e a amônia estão associados a descargas de efluentes e a águas recém poluídas. Com o tempo o nitrogênio orgânico é convertido em nitrogênio amoniacal e, posteriormente, em condições aeróbicas, a amônia é oxidada a nitrito e nitrato (MOTA, 1995). O fósforo aparece em águas naturais devido principalmente aos efluentes de origem doméstica e industrial. As águas drenadas em áreas agrícolas e urbanas também podem provocar a presença excessiva de fósforo nos rios por conta da aplicação de fertilizante no solo (TATTON, 2004).

2.6 QUALIDADE DE ÁGUA

A qualidade da água de um corpo hídrico é altamente variada, dependendo do ambiente de origem, por onde circula, percola ou onde é armazenada (JESUS; SOUZA, 2013). Dessa forma, uma complexa combinação de fatores naturais e antropogênicos podem comprometer a água em termos de quantidade e qualidade (ALLAN, 2004; BAKER, 2003). De fato, a qualidade da água de um rio reflete o uso e manejo do solo de sua bacia hidrográfica bem como

os fenômenos naturais que ali ocorrem (VON SPERLING, 1996). Conseqüentemente, uma grande quantidade de substâncias decorrentes de variações naturais ou de atividades antrópicas terão como destino final os ecossistemas aquáticos.

A presença de compostos tóxicos no ambiente está associada, muitas vezes, à proximidade com regiões industriais e agrícolas, onde geralmente se verifica a contaminação dos ecossistemas aquáticos (VALDEZ-DOMINGOS, 2006). A urbanização desordenada das bacias hidrográficas causa uma forte pressão nos sistemas hídricos. Como a qualidade dos rios está diretamente associada às atividades de suas bacias, essa ocupação altera não somente a qualidade da água dos rios, mas do ambiente como um todo (ALLAN, 1995). As conseqüências negativas do adensamento urbano nos corpos hídricos são diversas, entre elas destacam-se descargas de efluentes domésticos e industriais não tratados, contaminação por agrotóxicos (escoamento agrícola) e resíduos de atividades de mineração (TUCCI, 2008). Além disso, ocorre também a alteração das características naturais do ambiente, em muitos casos, devido à remoção da cobertura vegetal, erosão e assoreamento de rios e córregos. Estes fatores antrópicos vêm impactando os ecossistemas aquáticos reduzindo a qualidade da água como recurso econômico e ecológico (GOULART; CALLISTO, 2003).

O rápido crescimento populacional também é um fator negativo para a qualidade da água. A maior demanda por recurso hídrico resulta na escolha de novos mananciais de abastecimento público. Por outro lado, com esta demanda surge a necessidade de aprimoramento na gestão dos recursos hídricos. De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2014), esse aprimoramento envolve tratamento especial e diferenciado às bacias que contêm mananciais potenciais para o abastecimento. Uma vez que a qualidade da água bruta depende da forma pela qual os demais trechos da bacia são manejados, o planejamento urbano deveria se adequar à vocação natural do sistema hídrico.

Apesar desse cenário negativo, o interesse em melhorar a qualidade de água, preservar e conservar os mananciais vem crescendo ao longo dos anos. A qualidade de água para consumo humano tornou-se uma questão de interesse para a saúde pública no final do século 19 e início do século 20. Anteriormente, a qualidade da água era associada apenas a aspectos estéticos e sensoriais, tais como a cor, o gosto e o odor. No decorrer do século 20 a qualidade da água passou por profundas transformações. No Brasil, a normatização da qualidade da água prevê um padrão de potabilidade que envolve aspectos físicos, químicos e biológicos, com enfoque na desinfecção da água (FREITAS; FREITAS, 2005). No entanto, este ainda não é um modelo de controle de qualidade da água ideal, e o monitoramento adequado da qualidade de água no Brasil ainda é precário (SILVA-AUGUSTO et al., 2012).

A legislação atual vigente determina alguns padrões para avaliar a qualidade das águas superficiais. Os padrões utilizados constam na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA nº 357/2005) (BRASIL, 2005) que trata da classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, baseado no uso predominante atual e pretendido, sendo divididas em cinco classes de acordo com sua qualidade (ANEXO 1).

Na prática, essas leis são insuficientes para garantir a qualidade dos recursos hídricos. Para isso é necessária uma gestão integrada, envolvendo um manejo em seus diferentes usos, o que inclui a água para o consumo humano, a segurança alimentar e a proteção de ecossistemas (JOURAVIEV, 2001). Nesse sentido, é crescente a necessidade de um monitoramento mais abrangente de alterações da qualidade não somente da água, como também de todos os elementos fundamentais dos ecossistemas aquáticos e adjacentes.

Dentro deste contexto, um mecanismo adotado para minimizar a contaminação em áreas que abrigam ecossistemas de elevado valor ecológico e econômico é a criação de Unidades de Conservação (UCs). As UCs são áreas naturais passíveis de proteção por suas características especiais. São "espaços territoriais e seus recursos ambientais, incluindo as águas jurisdicionais, com características naturais relevantes, legalmente instituídos pelo Poder Público, com objetivos de conservação e limites definidos, sob regime especial de administração, ao qual se aplicam garantias adequadas de proteção da lei" (BRASIL, 2000).

As unidades de uso sustentável, também de grande interesse para a gestão dos recursos hídricos, são representadas pelas Áreas de Proteção Ambiental (APAs), nas quais são estabelecidas as diretrizes e normas para proteção e recuperação da qualidade ambiental de bacias hidrográficas com mananciais de interesse regional para o abastecimento público. As APAs têm como objetivo principal conservar a diversidade dos ambientes, espécies e processos naturais, sendo necessário orientar e adequar às várias atividades humanas de forma que se desenvolvam de maneira compatível com as características ambientais da região (PELLIZZARO et al., 2008).

A criação de áreas protegidas e de unidades de conservação é um importante avanço para a conservação dos recursos naturais no país. No entanto estes instrumentos não garantem a plena preservação de seus ecossistemas, de forma que a implementação de programas de biomonitoramento de ambientes aquáticos destinados ou não para o abastecimento público, se faz absolutamente necessário, tanto para o controle da qualidade hídrica quanto para o fornecimento de subsídios que auxiliem e fundamentem uma gestão de conservação mais eficiente e para o uso sustentável (AUGUSTO et al., 2012).

2.7 OS PEIXES COMO BIOMONITORES

Os peixes representam um grupo de vertebrados com diversas estratégias comportamentais e reprodutivas e desempenham um papel significativo na cadeia trófica (RAND, 2008). Algumas características destes organismos determinam seu elevado valor como elemento de qualidade biológica. Por exemplo, a ampla dispersão nos ambientes aquáticos, diversidade de relações funcionais, papel ecológico em teias alimentares, plasticidade alimentar, período de vida relativamente longo que permite observar efeitos de longo prazo e seu valor como recurso alimentar para os humanos que aumenta o nível de consciência pública para as necessidades de conservação (WHITFIELD; ELLIOTT, 2002; Van Der OOST et al., 2003; HARRISON; WHITFIELD, 2004).

Embora os peixes possam não ser os organismos aquáticos mais sensíveis a estressores químicos, eles certamente têm uma grande variedade de comportamentos que aumentam o seu potencial de exposição a produtos químicos em diferentes matrizes ambientais. Eles também respondem a agentes tóxicos de modo semelhante aos vertebrados superiores, o que permite avaliar substâncias que são potencialmente perigosas para os seres humanos (DELPECH et al., 2010). Existe ainda uma extensa literatura sobre o seu comportamento, fisiologia e os requisitos ambientais gerais, o que faz desses organismos excelentes modelos biológicos de estudo para diferentes áreas (RAND, 2008).

As muitas espécies de peixes conhecidas popularmente como lambaris (*Astyanax* sp.), vivem em pequenos riachos, lagos e rios de bacias hidrográficas de todo o ambiente tropical (GARUTTI; BRITSKI, 2000; INGENITO et al., 2004). O *Astyanax* sp. (Figura 2) é considerado um importante biomodelo em avaliações ecotoxicológicas, por demonstrar sensibilidade a mudanças em seu ambiente natural e possuir grande adaptabilidade a diferentes *habitats*. Além disso, exercem importante função na cadeia alimentar, fazendo parte da dieta de variados vertebrados, como mamíferos aquáticos, diversas aves e alguns anfíbios e répteis (GOMIERO; BRAGA, 2003). Espécies do gênero possui um grande valor ecológico como forrageiras (GODOY, 1975), e no geral apresentam hábitos alimentares variados, podendo ser encontradas zooplantívoras, insetívoras e principalmente onívoras, com elevada adaptabilidade ambiental (QUIRINO, 2015). Com isso, exercem um papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas (SANTOS, 1981).

As espécies pertencentes ao gênero, morfologicamente, caracterizam-se por apresentarem duas séries de dentes no pré-maxilar (série interna com 5 dentes), linha lateral completa e nadadeira caudal nua, coberta de escamas apenas na base (BRITSKI, 1972).

Taxonomia

Superclasse: Osteichthyes

Classe: Actinopterygii

Infraclasse: Teleostei

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Tetragonopterinae

(PAVANELLI, 2007).



Figura 2. Exemplar de *Astyanax* spp.

3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O município de Cianorte – Paraná (Figura 3-A) está localizado entre as coordenadas geográficas de 52° 35' de longitude oeste e 23° 40' de latitude sul, inserido na Mesorregião Noroeste Paranaense (precisamente na microrregião que recebe o seu nome), da qual fazem parte as microrregiões de Paranaíba e Umuarama (IBGE,1989) e no Terceiro Planalto Paranaense, mais especificamente no Planalto de Campo Mourão, de acordo com a subdivisão proposta por Maack (1968) e na divisa entre as bacias hidrográficas do rio Ivaí e do rio Piquiri. Ambos os rios são afluentes da margem esquerda do rio Paraná. A bacia do Ivaí drena uma área de 35.845 Km² e o rio percorre um trecho de 685 Km, desde a sua nascente até a foz, no rio Paraná. Dois subsistemas da bacia do Ivaí estão em território cianortense: o rio Ligeiro (com 51.850 metros de extensão e 24 afluentes) e o rio dos Índios (com 47.280 metros de extensão e 22 afluentes).

Na região predomina a Floresta Estacional Semidecidual. Esse tipo de bioma tem ocorrência na área dominada pelo clima Cfa, segundo a classificação de Köppen e apresenta características tropicais aparentando-se menos exuberante por se desenvolver em solos mais arenosos na área de ocorrência da Formação Caiuá (MAACK, 2002).

O ribeirão Bolivar (Figura 1-B) (23°39'22.05"S/52°39'46.74"O) está inserido na microbacia hidrográfica do rio dos Índios, porção média do rio, possui extensão total de aproximadamente 14.750 metros até sua confluência com o rio dos Índios. Ao longo de sua extensão, em seu entorno, há predomínio do cultivo de soja, atividades de pastoreio e intervenções antrópicas como pontes e tubulações. Sua água é captada para tratamento e abastecimento público do município de Cianorte – Estado do Paraná (23°39'44.79"S/52°36'46.80"O) (Figura 3- A).

A bacia do rio Ligeiro (23°47'00.64"S/52°33'25.46"O), no noroeste do estado do Paraná, possui área de aproximadamente 775 km² (24°00' 23°30' S/ 52°20' 52° 42' O) (MARCOTTI; MARCOTTI, 2011) percorre aproximadamente 82 km até desaguar como afluente da margem esquerda do rio Ivaí e suas nascentes surgem próximas às cidades de Campo Mourão e Araruna (DESTEFANI, 2005), e suas nascentes surgem próximas a centros urbanos e áreas rurais. Ao longo de sua extensão, em seu entorno, há predomínio do cultivo de soja, atividades de pastoreio e intervenções antrópicas como pontes e tubulações. Sua qualidade está sob investigação para captação futura destinada ao abastecimento público do município de Cianorte.

O rio dos Índios ($23^{\circ}52'31.44''\text{S}/52^{\circ}41'38.50''\text{O}$), que possui um trecho dentro da Reserva Biológica das Perobas, tem parte de suas nascentes protegidas por florestas de Mata Atlântica e é um dos principais afluentes da margem esquerda do Ivaí. A Reserva é uma Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral da Natureza sob jurisdição federal. É representativa de ambientes florestais da Mata Atlântica, bioma que tem apenas 4,3% do território que é protegido por Reservas Biológicas Federais. Sua zona de amortecimento ocupa um território de 8.716 hectares que abrange parte dos municípios de Tuneiras do Oeste e Cianorte, no norte do Estado do Paraná, coordenadas geográficas $23^{\circ}51'\text{S} / 52^{\circ}45'\text{O}$. A Unidade está inserida no divisor de águas das bacias dos rios Ivaí e Piquiri, afluentes da margem esquerda do trecho alto do rio Paraná. Constitui a maior área de floresta remanescente das regiões norte e noroeste do Estado do Paraná. Está presente em área de transição entre as fitofisionomias Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Mista (BRASÍLIA, 2010).

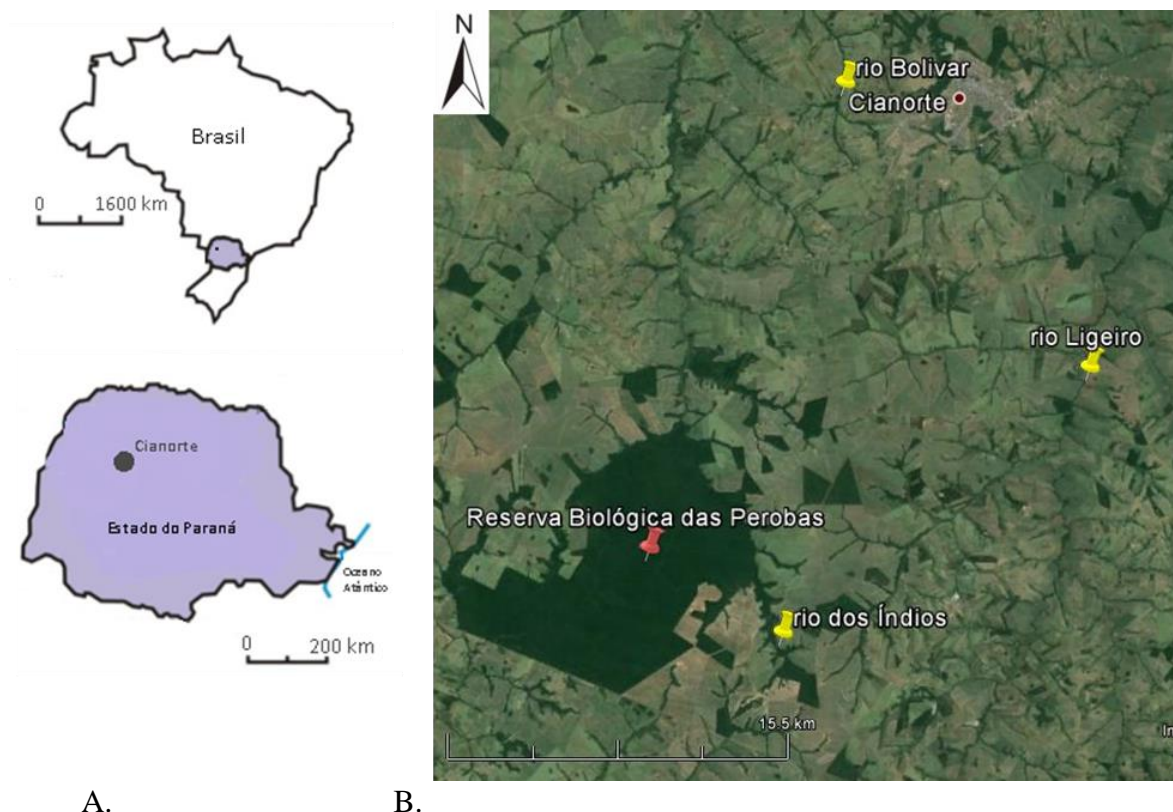


Figura 3. A. Localização geográfica do município de Cianorte, Leli et al. (2010) com modificações. B. Localização dos rios avaliados: Bolivar (L1), Ligeiro (L2) e dos Índios (REF) (Google Earth, 2015).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigou-se a qualidade ambiental de ríchoas neotropicais pertencentes a bacia do rio Ivaí por meio de um protocolo de avaliação rápida (PAR) adaptado ao Arenito Caiuá e biomarcadores de estresse oxidativo e de outros parâmetros biológicos que possibilitam detectar e avaliar efeitos tóxicos de contaminantes em peixes nativos representativos da biota aquática.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização ambiental dos corpos hídricos estudados por meio da aplicação de um PAR de *habitats* adaptado ao arenito Caiuá.
- Avaliar parâmetros físicos e químicos da água, aspectos populacionais, análise histológica em brânquias e fígado e biomarcadores bioquímicos em *Astyanax* spp. de riachos com diferentes níveis de interferência antrópica e de preservação.

REFERÊNCIAS

- AAS, E.; BEYER, I.; GOKSOYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. **Biomarkers**, v. 5, p. 9-23, 2000.
- ABILHOA, V. Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, eleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, p. 997–1005, 2007.
- ABILHOA, V.; AGOSTINHO, A.A. Aspectos biológicos de duas espécies de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) em lagoas marginais do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia** v.29, p.23-32, 2007.
- ADAMS, S. M. Biological indicators of stress in fish. **American Fisheries Society Symposium** 8, 1990.
- ADAMS, S.M.; BROWN, A.M; GOEDE, R.W. **A Quantitative Health Assessment Index for Rapid Evaluation of Fish Condition in the Field**. Journal: Transactions of the American Fisheries Society, 122:1, January 1993, pages 63-73.
- ADAMS, S.M. Establishing causality between environmental stressors and effects on aquatic ecosystems. **Human and Ecological Risk Assessment**, v.9, p.17–35, 2003.
- ADAMS, S.M.; GIESY, J.P.; TREMBLAY, L.A.; EASON, C.T. The use of biomarkers in ecological risk assessment: Recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. **Biomarkers**, v. 6, p.1–6, 2001.
- ADAMS, S.M.; GREELEY, M.S. Ecotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. **Water, Air, & Soil Pollution** \v.123, p.103–15, 2000.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Journal of Fish Disease**, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.
- AKAISHI, F. M.; ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C.; EIRAS-STOFELLA, D. R. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 253, p. 244-253, 2004.
- ÅKERBLOM, N.; OLSSON, K.; BERG, A.H.; ANDERSSON, P.L.; TYSKLIND, M.; FÖRLIN, L.; NORRGREN, L. Impact of polychlorinated naphthalenes (PCNs) in juvenile Baltic salmon, *Salmo salar*: evaluation of estrogenic effects, development, and CYP1A induction. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.38, p. 225–233, 2000.
- AKERMAN, G.; AMCOFF, P.; TJARNLUND, U.; FOGELBERG, K.; TORRISSEN O.; BALK, L. Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney. **Chemico-Biological Interactions**., v.142, p.269-283, 2003.

- ALBERTS, A.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**, Editora Artmed, 3. ed., 1997. 1294 p.
- ALLAN, J. D. Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics** 35:257-84. 2004.
- ALLAN, J.D. Stream Ecology. **Structure and function of running waters**. Chapman & Hall. New York. 1995.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.
- ANENE, A. Condition Factor of Four Cichlid Species of a Man-made Lake in Imo State, Southeastern Nigeria. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.5, p.43-47, 2005.
- ANZECC. Australian water quality guidelines for fresh and marine waters. National Water Quality Management Strategy Paper No 4, Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, Canberra, 1992.
- ARAÚJO, M. L. P. O efeito do pesticida metil-paration em *Astyanax altiparanae* (lambari) por meio de parâmetros morfológicos e bioquímicos. Monografia (Graduação). Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- ARAÚJO, V. S.; SANTOS, J. P.; ARAÚJO, A. L. C. Monitoramento das águas do Rio Mossoró/RN, no período de abril/2005 a julho/2006. **Holus**, 3, maio de 2007.
- ARENDRT, J.D. Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. **The Quarterly Review of Biology**, v.72, p.149–177, 1997.
- AUGUSTO, L. G. S.; GURGEL, D. G. I.; CÂMARA NETO, F. H.; MELO, H. C.; COSTA, M. A. O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, 2012.
- AVCI, A.; KAÇMAZ, M.; DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.60, p.101-105, 2005.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. Trad. Maria A. L. R. 2a ed. Porto Alegre: Bookman, 622p., 2002.
- BAKER, J. M. Recalcitrant problems in environmental instrumentation. **Agronomy Journal**, v.95, p.1404-1407, 2003.

BAKER, J. R.; PECK, D. V.; SUTTON, D. W. eds. Environmental Monitoring and Assessment Program Surface Waters: **Field Operations Manual for Lakes**. EPA/620/R-97/001.U.S. Environmental Protection Agency. Corvallis, Oregon. 37p. 1997.

BALK, L.; HYLLAND, K.; HANSSON, T.; BERNTSSEN, M. C.; BEYER, J.; JONSSON, G.; MELBYE, A.; GRUNG, M.; TORSTENSEN, B. T.; BORSETH, J. F.; SKARPHEDINSDOTTIR, H.; KLUNGSOYR, J. Biomarkers in natural fish populations indicate adverse biological effects of offshore oil production. **Plos one** [online serial] v.6, 2011.

BARTELL, S. M. Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment—A Brief Review and Evaluation Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment. **Environmental Bioindicators**, v.1, p.60–73, 2006.

BEAUVAIS, S.L.; COLE, K.J.; ATCHISON, G.J.; COFFEY, M. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Water Air Soil Pollution**, v. 135, p. 249–264, 2002.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T., Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v.22, p. 25-34, 1999.

BEROYA-EITNER, M. A. Ecological vulnerability indicators. **Ecological Indicators**. v. 60, p. 329–334, 2016.

BISHAYI, B.; SENGUPTA, M. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* due to alteration of cellular activity in arsenic and lead intoxicated mature Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 184, p. 31–39, 2003.

BIZERRIL, C.R.S.F. Mudanças temporais de comunidades ícticas em uma bacia hidrográfica do leste brasileiro. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, Série Zoologia, v.10, p. 53-75, 1997.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, p.205-213, 2011.

BOMBAIL, V.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnelus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 283-392, 2001.

BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L. F. The role of glutathione and glutathione S transferases in mercapturic acid biosynthesis. **Advances Enzymology Relatives Areas Molecular Biology**, v. 32, p.173-219, 1969.

BRAGA, F. M. S. Feeding and condition factor of characidinn fish in Ribeirão Grande system, Southeastern Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.27, p.271-276, 2005.

BRASIL. Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. p.79-108. In: Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguai. **Poluição e piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, p. 108, 1972.

- BROEG, K.; KOHLER, A.; WESTERNHAGEN, H.V. Disorder and ϵ recovery of environmental health monitored by means of lysosomal stability in liver of European flounder *Platichthys flesus* L. **Marine Environmental Research**, v.54, p.569–573, 2002.
- BROWN, L.R. Fish Communities and Their Associations with Environmental Variables, Lower San Joaquin River Drainage, California. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, p. 251, 2000
- BRUSL'E, J.; GONZ'ALEZ, I.; ANADON, G. The structure and function of fish liver. In: **Fish Morphology** (J. S. D. Munshi and H. M. Dutta, eds.), Science Publishers Inc., New York. 1996.
- BURGER, J.; GOCHFELD, MICHAEL. On developing bioindicators for human and ecological health. **Environmental Monitoring and Assessment** v.66, p.23–46, 2001.
- CAIRNS, J. C.; MCCORMICK, P. V.; NIEDERLEHNER, B. R. A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. **Hydrobiologia** v.263, p.1–44, 1993.
- CARNEY, J.M.; STARKE-REED, P.E.; OLIVER, C.N.; LANDUM, R.W.; CHENG, M.S.; WU, J.F.; FLOYD, R.A. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butylalpha-phenylnitron. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, p.3633–3636, 1991.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p.2123-2136, 1990.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264–271, 2005.
- CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.52, p. 83-91, 2002.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-61, 2004.
- CONNELL, D.W.; LAM, P.K.S.; RICHARDSON, B.R.; WU, R.S.S. **Introduction to Ecotoxicology**. Blackwell Science, Abingdon. 170 pp. 1999.
- CORTES, R.M.V.; HUGHES, S.J.; PEREIRA, V.R.; VARANDAS, S.G.P. Tools for bioindicator assessment in rivers: The importance of spatial scale, land use patterns and biotic integration. **Ecological Indicators**, v.34, p.460-477, 2013.
- COSSU, C.; DOYOTTE, A.; JACQUIN, M. C. Glutathione reductase, selenium dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers contamination in field studies. **Ecotoxicol. Environmental Safety**, v. 38, p. 122-131, 1997.

COSTA, C.; SILVA, S.; NEVES, J.; COELHO, P.; COSTA, S.; LAFFON, B.; SNAWDER, J.; TEIXEIRA, J. P. Micronucleus Frequencies in Lymphocytes and Reticulocytes in a Pesticide-Exposed Population in Portugal. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.74, p.960-970, 2011.

CUI, Y.; KÖNIG, J.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; KEPPLER, D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, 2001.

CUNHA, A. C. Levantamento de parâmetros físico-químicos e hidráulicos para a avaliação da qualidade da água em escoamentos naturais – desenvolvimento do distrito industrial/AP na Bacia do Rio Matapi. Relatório Anual. Macapá: CNPq/IEPA/Gerco, 58p, 2001.

D'ISCHIA, M.; CONSTANTINI, C.; PROTA, G. Lipofuscin-like pigments by autoxidation of polyunsaturated fatty acids in the presence of amine neurotransmitters: the role of malondialdehyde. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1290, p. 319–326, 1996.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23–38, 2003.

DAVIES K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society Symposium**, v. 61, p. 1–31, 1995.

DAVIES, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 9895–9901, 1987.

DE ANDRADE BRITO, I.; FREIRE, C.A.; YAMAMOTO, F.Y.; SILVA DE ASSIS, H.C.; RODRIGUES, L.S.B.; CESTARI, M.M.; GHISI, N.C.; PRODOCIMO, V.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. **Journal of Environmental Monitoring**, v.14, p.615-625, 2012.

DELPECH, C.; COURRAT, A.; PASQUAUD, S.; LOBRY, J.; LE PAPE, O.; NICOLAS, D.; BOET, P.; GIRARDIN, M.; LEPAGE, M. Development of a fish-based index to assess the ecological quality of transitional waters: The case of French estuaries. **Marine Pollution Bulletin** v.60, p.908-918, 2010.

DEPLEDGE, M.H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In:Fossi, M.C., and Leonzio, C. (Eds.) *Nondestructive Biomarkers in Higher Vertebrates*. Lewis, Boca Raton, Florida. 1993.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G. (Ed.), **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Taylor and Francis, London, 1995.

DIXON, D. R.; PRUSKI, A. M.; DIXON, L. R. J.; JHA, A. N. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v.17, p.495–507, 2002.

- EISLER, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife and invertebrates. A synoptic review: Laurel, Md., Patuxent Wildlife Research Centre. U.S Fish and Wildlife Service. **Biological Report**, v.85, p. 81, 1987.
- ERGENE, S.; CAVAS, T.; CELIK, A.; KÖLELI, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.48, p.421–429, 2007.
- ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.64, p.418-425, 2000.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.11, p.81–128, 1991.
- ESTEVEZ F. A. **Fundamentos de Limnologia**, 2^a.ed. Interciência. 602p. 1998.
- FARBER, J. M.; LEVINE, R.L. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. **The Journal of Biological Chemistry** v. 261, p. 4574–4578, 1986.
- FAUSCH, K.D.; LYONS, J.; KARR, J.R.; ANGERMEIER, P.L. Fish communities as indicators of environmental degradation. **American Fisheries Society Symposium**, v.8, p. 123-144, 1990.
- FENECH, M. The in vitro micronuclei technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.
- FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, p. 131-136, 2000.
- FILIPAK NETO, F. **Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus***. Universidade Federal do Paraná. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Curitiba, 2007.
- FLEEGER, J.W.; CORMAN, K.R.; NISBET, R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science the Total Environmental**, v. 317, p. 207- 233, 2003.
- FONSECA, V. F. S. **Fish physiological and biochemical responses as indicators of habitat quality in estuarine systems**. 2010. Universidade de Lisboa, Dissertação (Doutorado) Biologia Marinha e Aquacultura, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências, 2010.
- FONSECA, V.F.; VINAGRE, C.; CABRAL, H.N. Growth variability of juvenile soles *Solea solea* and *Solea senegalensis*, and comparison with RNA: DNA ratios in the Tagus estuary, Portugal. **Journal of Fish Biology**, v.68, p.1551-1562, 2006.

- FONTOURA, N.F.; BRAUN, A.S.; LEWIS, D. DOS S.; SOUTO, G. D. DE B. Dinâmica Populacional da ictiofauna da lagoa Fortaleza, Cidreira, Rio Grande do Sul. II. *Astyanax alburnus* (Hensel, 1870) (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Biociências**, v. 1, p. 77-94, 1993.
- FÖRLIN, L.; ANDERSSON, T.; BALK, L.; LARSSON, Å. Biochemical and physiological effects of bleached pulp mill effluents in fish. *Ecotoxicol. Environmental Safety*, v.30, p.164–170, 1995.
- FÖRLIN, L.; HAUX, C. Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. **Journal of Endocrinology**, v.124, p.207–213, 1990.
- FOSSI, M.C.; MASSI, A.; LEONZIO, C. Blood esterase inhibition in birds as an index of organophosphorus contamination: field and laboratory studies (Article) **Ecotoxicology** v.3, p. 11-20, 1994.
- FRÄNZLE, O. Complex bioindication and environmental stress assessment. **Ecological Indicators**, v.6, p. 114–136, 2006.
- FREITAS, M. B.; FREITAS, C. M. DE. A vigilância da qualidade da água para consumo humano – desafios e perspectivas para o Sistema Único de Saúde. **Ciências e saúde coletiva**, v.10, 2005.
- GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia**, Série Zoologia, Porto Alegre, 13: 65-88. 2000.
- GERHARDT, A. The Multispecies Freshwater Biomonitor: Applications in ecotoxicology and water quality monitoring. In: KARTHE, D. et. al. (eds.): **Water and Environment in the Selenga-Baikal Basin**. 366 pp. ibidem Verlag, 2015.
- GHISI, N. DE C.; ITO, K. M.; PRIOLI, A. J.; OLIVEIRA, E. C. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Astyanax aff. paranae* (piscis) em corpos hídricos com diferentes níveis de interferência antrópica, no centro-oeste do paraná. **Ciências Biológicas e da Saúde, UEPG**, v.18, p. 53-60, 2012.
- GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; MORAES, B.S.; SIMÕES, R.R.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; LORO, V.L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.519–524, 2007.
- GODOY, M. P. **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**, Franciscana, São Paulo. 1975.
- GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. O lambari *Astyanax altiparanae* pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum**, v. 25, p. 353-360, 2003.
- GOULART, M.D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista FAPAM**, ano 2, 2003.

- GRISOLIA CK. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução**. p. 392. Editora da UNB; Brasília: 2005.
- GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, v. 491, p. 39-44, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York, NY: Oxford University Press, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.
- HARRISON, T. D.; WHITFIELD, A. K. A multi-metric fish index to assess the environmental condition of estuaries. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p.683–710, 2004.
- HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. CRC Press, Boca Raton, Fl. 1995.
- HINTON, D. E.; SEGNER, H.; AU, D. W. T.; KULLMAN, S. W.; HARDMAN, R. C. Liver toxicity. In: GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The toxicology of fishes**. CRS Press., p.326-400, 2008.
- HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, JR. P.M.; BERGMAN. H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton, Fla.: Lewis. 346 p. 1992.
- HUUSKONEN, S. E.; LINDSTRÖM-SEPPA, P. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. **Aquatic Toxicology**, v.31, p.27-41, 1995.
- IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A.; ORSIERE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. **Mutation Research**, v.658, p.215–233, 2008.
- IKENAKA, Y.; EUN, H.; WATANABE, E.; KUMON, F.; MIYABARA, Y. Estimation of sources and inflow of dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons from the sediment core of Lake Suwa. Japan Journal: **Environmental pollution**, v.138, p.529-537, 2005.
- INGENITO, L. F. S.; DUBOC, L. F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** v.7, p. 23-36, 2004.
- JACKSON, A.L.; LOEB, L.A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. **Mutation Research**., v.477, p.7–21, 2001.
- JESUS, D.B.M.; SOUZA, R.C.A. Avaliação da qualidade da água do Rio São Francisco na região de Bom Jesus da Lapa, BA, e as atividades antrópicas relacionadas. In: XII SEPA – Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, Atas, p. 73-84. 2013.
- JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. v. 23, p.207-21, 2008.

- JHA, A.N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. **Mutation Research**, v. 552, p.1–17, 2004.
- JIN, Y.; ZHANG, X.; SHU, L.; CHEN, L.; SUN, L.; QIAN, H.; LIU, W.; FU, Z. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, p. 846–52, 2010.
- JONES, R. E.; PETRELL, R. J.; PAULY, D. Using modified lengthweight relationships to assess the condition of fish. **Aquacultural Engineering**, v.20, p.261-276, 1999.
- JOURAVLEV, A. Drinking water supply and sanitation services on the threshold of the XXI century. Santiago do Chile: Cepal, 2004.
- KAPPUS, H.; SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. **Experientia**, v.37, p.1233-41, 1981.
- KICENIUK, J. W.; KHAN, R. A. Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic exposure. **Canadian Journal of Zoology**, v.65, p.490-494, 1987.
- KLEIN, S.M.; COHEN, G.; CEDERBAUM, A.I. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulphoxide by hydroxyl radical generating system. **Biochemistry**, v. 20, p. 6006–6012, 1991.
- KLOBUCAR, G.I.V.; MAGUIRE, I.; GOTTSTEIN, S.; GELDER, S. R. Occurrence of Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) on freshwater crayfish in Croatia. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, v. 42, p.251-260, 2006.
- KLOEPPER-SAMS, P.J.; OWENS, J.W. Environmental biomarkers as indicators of chemical exposure. **Journal of Hazardous Materials**, v.35, p.283-294, 1993.
- KODO FILHO, A.K. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce**. Curitiba, PR: UFPR, 2006. 95p. Dissertação (Mestrado) - Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- KOSMALA, A.; CHARVET, S.; ROGER, M.-C.; FAESSEL, B. Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.41, p.19-28. 1998.
- KREINER, A.; VAN DER LINGEN, C. D.; FRÉON, P. A comparison of condition factor and gonadosomatic index of sardine *Sardinops sagax* stocks in the Northern and Southern Benguela upwelling ecosystems, 1984-1999. **African Journal of Marine Science**, v. 23 p.23-34, 2001.
- KUCHINO, Y.; MORI, F.; KASAI, H.; INOUE, H.; IWAI, S.; MIURA, K.; OHTSUKA, E.; NISHIMURA, S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. **Nature**, v.327, p. 77 – 79, 1987.
- LAM, P. K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**. v. 52, p.348–35, 2009.

LAM, P.K.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v.46, p.182-6, 2003.

LANDIS, W.G.; YU, M.H. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemical upon ecological systems. Florida: Lewis Publishers. 1995.

LARSEN, H.E.; CELANDER, M.; GOKSØYR, A. The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.10, p.291–301 1992.

LAURENT, P. L.; PERRY, S. F. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, v.259, p.429–442, 1990.

LEMONS, C.T.; TERRA, N. R. Poluição – Causas, efeitos e controle. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética toxicológica**. 424p. Porto Alegre: Alcance, 2003.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, p.13-30, 2010.

MAIER, M. H. Ecologia da bacia do rio Jacaré Pepira (47°55" - 48°55"W; 22°30" - 21°55"S - Brasil): qualidade da água do rio principal. **Ciência e Cultura**, v.39, p.164-185, 1987.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fish and Aquatic Science**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**. v. 424, p. 83–95, 1999.

MATHEUS, C.E.; TUNDISI, J.G. Estudo físico químico e ecológico dos rios da bacia hidrográfica do Ribeirão e represa do Lobo. In **Limnologia e Ecologia de Represas**. (J.G. Tundisi, ed.). ACIESP; FAPESP; CNPq; UNEP; UNCRD, v.1, tomo 1, p.419-472. Série Monografias em Limnologia, 1988.

MATTHEWS, W.J. **Patterns in Freshwater Fish Ecology**. New York: Chapman and Hall, p.756 1998.

MAYER, F.L.; VESTEER, D.J.; MCKEE, M.J.; FOLMAR, L.C.; GRANEY, R.L.; MCCUNE, D.C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M. JR; BERGMAN, H.L. (Eds) **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. pp 5-85, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, 1992.

MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. **Biological Markers of Environmental Contamination**. Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, FL. 1990.

MCKIM, J.M.; ERICKSON, R.J. Environmental impacts on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. **Physiological zoology**, v.64, p.39–67, 1991.

- MCMASTER, M.E.; VAN DER KRAAK, G.J.; PORTT, C.B.; MUNKITTRICK, K.R.; SIBLEY, P.K.; SMITH, I.R.; DIXON, D.G. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker population (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached kraft pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v.21, p.199-218, 1991.
- MEIRE, R.O.; A. AZEREDO & J.P.M. TORRES. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasilienses** v.11, p.188-201, 2007.
- MENICONI, M.F.G. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no Meio Ambiente: Diferenciação de Fontes em Sedimentos e Metábolitos em Biles de Peixes**. RN: UFRN, 2007. 194p. Tese (Doutorado) - Natal, UFRN, 2007.
- METCALF, R. L. Structure-activity relationships for insecticidal carbamates. **Bulletin of Wolrd Health Organization**, v.4, p.43-78, 1971.
- MORAES, B. S.; LORO, V.L.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S.O. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v..68, p.1597–1601, 2007.
- MOTA, S. **Preservação de recursos hídricos**. ABES,1995
- MURPHY, S. D. Pesticides. In: DOUL, J., KLASSEN, C.D., ANDERS, M. O. (Eds.) **The Basic Science of Poisons**. Macmillan, New York, pp. 519-581, 1986.
- MUSTAFA, S. A.; AL-SUBIAI, S. N.; DAVIES, S. J.; JHA, A. N. Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Ecotoxicology**, v.20, p. 1455–1466, 2011.
- MUSTAFA, S.A.; KARIEB, S.S.; DAVIES S, J.; JHA, A.N. Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, 2014.
- MYERS, M.S.; FOURNIE, J.W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: ADAMS, S. M., ed., **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. p. 221-288, 2002.
- NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. Pp. 413-431. In: ZAGATTO P.A; BERTOLETTI, E. (eds.). **Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações**. São Paulo. 2006.
- NEGREIROS, L. A.; SILVA, B. F.; PAULINO, M. G.; FERNANDES, M. N.; CHIPPARIGOMES, A. R. Effects of hypoxia and petroleum on the genotoxic and morphological parameters of *Hippocampus reidi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 153A, p. 408-414, 2011.

NETTO, A.D.P.; DIAS, J.C.M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.F.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, p.765–773, 2000.

NIEMI, G. J.; MCDONALD, M. E. Application of ecological indicators. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.35, p.89–111, 2004.

NIKOLSKY, G.V. **Theory of fish population dynamics**. Edinburgh, Oliver e Boyd, 323p. 1969.

NOAKSSON, E.; TJÄRNLUND, U.; BOSVELD, A. T. C.; BALK, L. Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.174, p. 160–176, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endossulfan. **Aquatic Toxicology**, v.23, p.65-84, 1992.

O'BRIEN, R.D. Acetylcholinesterase and its inhibition. In: WILKINSON, C.F. (Ed.). **Insecticide Biochemistry and Physiology**. New York: Plenum, p.271-296. 1976.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., VOLLAIRE, Y., SANCHEZ-CHARDI, A., ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargueb Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53-69, 2005.

PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M. N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 1–7, 2012.

PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 80, n. 1, p. 6– 13, 2012.

PAVANELLI, C. S. Família Parodontidae. In: BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.;GHAZZI, M.S. (Ed.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, P. 18-19. (Série Livros, 23). 2007.

PAVEI, P.T. **Caracterização e estudo do comportamento de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em ecossistemas aquáticos contaminados pelas atividades de mineração de carvão**. Criciúma- SC: 2007. 154p. Dissertação (Mestrado) – Santa Catarina, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2007.

PEAKALL, D. B.; SHUGART, L.R. **Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health**. NATO ASI Series H: vol. 68, Springer-Verlag, Heidelberg, 1993.

PELLIZZARO, P.C.; HARDT, L.P.A.; BOLLMANN, H.A.; HARDT, C. Urbanização em áreas de mananciais hídricos: estudo de caso em Piraquara, Paraná. **Cadernos Metr pole**, n.19, p. 221-243, 2008.

PEREIRA, J. J.; MERCALDO-ALLEN, R.; KUROPAT, C.; LUEDKE, D.; SENNEFELDER, G. Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.24, p.427–431, 1993.

PERES NETO, P.R.; BIZERRIL, C.R.S.F.; IGLESIAS, R. An overview of some aspects of river ecology: a case study on fish assemblages distribution in an eastern Brazilian coastal river. **Oecologia Brasiliensis**, n. 1, p. 317-334, 1995.

PERSIC, A. **Modalit s de contamination par polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables**. Thèse (Doctorat en Sciences). Universit  Paris XI – Orsay/France, 2004.

PHELAN, B. A.; GOLDBERG, R.; BEJDA, A. J.; PEREIRA, J.; HAGAN, S.; CLARK, P.; STUDHOLME, A. L.; CALABRESE, A.; ABLE, K. W. Estuarine and habitat-related differences in growth rates of young-of-the-year winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and tautog (*Tautoga onitis*) in three northeastern U.S. estuaries. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** v.247, p.1–28, 2000.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD R. (editors). **Sublethal and chronic effects of pollution on freshwater fish**. FAO Fishing News Books, pp. 339-352. 1994.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v.30, p.2290–2787, 1995.

PORTO, R. L.; BRANCO, S.M.; CLEARY, R.W.; COIMBRA, R.M.; EIGER, S.; LUCA, S.J.; NOGUEIRA, V.P.Q.; PORTO, M.F.A. **Hidrologia ambiental**. São Paulo, Ed. da USP, ABRH. Cole o ABRH de Recursos Hídricos, p 414, v. 3. 1991.

QUIRINO, B. A. Efeitos do pulso de inunda o sobre a dieta de *Moenkhausia forestii* (Characidae, Characiformes) em uma lagoa da planície de inunda o do alto rio Paraná. Universidade Estadual de Maringá, 20 p. 2015.

RAM, R.N.; SATHYANESAN, A.G. Effect of a mercurial fungicide on the gonadal development of the teleostean fish *Channa punctatus* (Bloch). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.11, p.352–360, 1986.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington. p. 665, 1985.

REIS-HENRIQUES, M. A.; FERREIRA, M.; COIMBRA, A.M.; D'SILVA, C.; COSTA, J.; SHAILAJA, M.S. Phenanthrene and nitrite effects on juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, using hepaticbiotransformation enzymes, biliary fluorescence, and micronuclei as biomarkers. **Ciencias Marinas**, v. 35, p. 29-40 2009.

REYNAUD, S.; DESCHAUX, P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. **Aquatic Toxicology**, v.77, p. 229-238, 2006.

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

ROJAS-GARCÍA, A.E.; MEDINA-DÍAZ, I.M.; ROBLEDO-MARENCO, M.L.; BARRÓN-VIVANCO, B.S.; PÉREZ-HERRERA, N. **Pesticide Biomarkers, Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment**, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), 2011.

RUDDOCK, P. J.; BIRD, D. J.; MCCALLEY, D. V. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, p. 147-153, 2002.

S. LIEBEL, M.E.M. TOMOTAKE, E C.A. OLIVEIRA RIBEIRO . Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality Ecotoxicol. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, 2013, 09-15 doi: 10.5132/eec.2013.02.002

SAKURAGUI, M.M.; PAULINO, M.G.; PEREIRA, C.D.S.; CARVALHO, C.S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; FERNANDES M.N. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environmental Pollution**, v.178, p.41-51, 2013.

SALVAGNI, J.; TERNUS, R. Z.; FUENTEFRIA, A. M. Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, p.122–126, 2011.

SANCHEZ, W.; PORCHER, J.M. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive. **TRAC-Trend Anal Chem.**, v.28, p.150-158, 2009.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Ed. Itatiaia. Belo Horizonte. 1981.

SEDEÑO-DÍAZ, J. E.; LÓPEZ-LÓPEZ, E. **Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review**. New Advances and Contributions to Fish Biology, Prof. Hakan Turker (Ed.), 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/new-advances-and-contributions-to-fish-biology/fish-as-sentinel-organisms-from-the-molecular-to-the-population-level-a-review>

SERRANO-GARCÍA, L.; MONTERO-MONTOYA, R., Micronuclei and chromatid buds are the results of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.38-45, 2001.

SHEPHARD, K.L. Functions for fish mucus. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.4, p.401-429, 1994.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of Cell Biology**, v.140, p.1307–1320, 1998.

- SILVA, P. P.; PESO-AGUIAR, M. C.; RIBEIRO, G. Ciclo gametogênico e comportamento reprodutivo de *Iphigenia brasiliiana* (Mollusca, Bivalvia, Donacidae) no estuário do rio Subaé, Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre*, v. 102, p.359-369, 2012.
- SILVA-AUGUSTO, L. G. DA; GURGEL, I. G. D.; CÂMARA NETO, H. F.; MELO, C. H. DE; COSTA, A. M. O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.17, p.1511-1522, 2012.
- SINGH, H. Interactions of xenobiotics with reproductive endocrine functions in a Protogynous teleost, *Monopterus albus*. *Marine Environmental Research*, v.28, p. 285–289, 1989.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v.175, p.184–191, 1988.
- SPIES, R. B.; STEGEMAN, J. J.; HINTON, D. E.; WOODIN, B.; SMOLOWITZ, R.; OKIHIRO, M.; SHEA, D. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel. *Aquatic Toxicology*, v.34, p.195- 219, 1996.
- STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.899, p.191-208, 2000.
- STEEN, D.A.; GIBBS, J.P. Effects of Roads on the Structure of Freshwater Turtle Populations. *Conservation Biology*, v.18, p.1143–1148, 2004.
- STEHFEST, H. **Mathematical modelling of self-purification of rivers** (in German). Report KFK 1654 UF, Kernforschungszentrum, Karlsruhe, Karlsruhe, W.-Germany. English translation as IIASA PP-77-11, International Institute for Applied Systems Analysis, Laxenburg, Austria. 1973.
- STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p.20963–20966, 1997.
- STEPHENSON, L.S.; LATHAM, M.C.; OTTESEN, E. A. Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology*, v.121, p.23–38, 2000.
- STERN, A. Red cell oxidative damage. In: SIES, H. (Ed.), **Oxidative Stress**. Academic Press, London, p.331, 1985.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology**. Normal and pathological features. 2 nd ed. Tokyo, Kodansha Ltd. 1995.
- TAO, S.; WEN, Y.; LONG, A.M.; DAWSON, R.; CAO, J.; XU, F.L. Simulation of acid-base condition and copper speciation in the fish gill microenvironment. *Journal of Computational Chemistry*, 25, 215–222, 2001.

TATTON, J. E. **Água na história até o ano zero da era cristã**. Associação guardiã da água, São Paulo, SP, 2004.

THOMAS, P. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. **Marine Environmental Research** v.24, p.179–183, 1988.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TORRES, J.P.M. **Ocorrência de micropoluentes orgânicos (organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em sedimentos fluviais e solos tropicais**. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

TRUSCOTT, B.; WALSH, J. M.; BURTON, M. P.; PAYNE, J. F.; IDLER, D. R. Effect of acute exposure to crude petroleum on some reproductive hormones in salmon and flounder. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.75, p.121-130, 1983.

TUCCI, C. E. M. **Água no meio urbano**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Capítulo 14 do Livro *Água Doce*. 1997.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 631p. 2008.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatix Toxicology**, v.79, p.201–204, 2006.

VALDEZ-DOMINGOS, F. X. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes**. Curitiba: UFPR, 2006, 130 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v. 631, p. 36-43, 2007.

VASCONCELOS, J. F.; BARBOSA, J. E. L.; DINIZ, C. R.; CEBALLOS, B. S. O. **Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores**. João Pessoa, 2011. Disponível em: [http://www.ablimno.org.br/boletins/pdf/bol_39\(2-2\).pdf](http://www.ablimno.org.br/boletins/pdf/bol_39(2-2).pdf). Acesso em: 2 de Junho de 2014.

VASCONCELOS, R.P.; REIS-SANTOS, P.; FONSECA, V.; RUANO, M.; TANNER, S.; COSTA, M.J.; CABRAL, H. Juvenile fish condition in estuarine nurseries along the Portuguese coast. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.82, p.128-138, 2009.

VASCONCELOS, V. M. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.32, n.3, p. 249-254, 1999.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, v.28, p.711-717, 2003.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, v.28, p.711-717, 2003.

VEIGA M.M.; SILVA, D.M.; VEIGA, L.B.E.; FARIA, M.V.C. Pesticide pollution in water systems in a small rural community in Southeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.22, p.2391-2399, 2006.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.281-300, 2007.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos** - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte, UFMG. v.2. 1996.

WHITFIELD, A. K. ELLIOTT, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: A review of progress and some suggestions for the future. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p.229-250, 2002.

WIEACKER, P.; MUELLER, C. R.; MAYEROVA, A.; GRZESCHIK, K. H.; ROPERS, H. H. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Annales de Génétique**, v.23, p. 73-77, 1980.

WILLIAMS, L.R.R.; KAPUSTKA, L.A. Ecosystem vulnerability: a complex interface with technical components. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, p.1055-8, 2000.

WOOTTON, R. G. **Ecology of Teleost Fishes**. London, Chapman & Hall, 404p. 1991.

WU, R.S.; SIU, W.H.; SHIN, P.K. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. **Marine Pollution Bulletin**, v.51, p.8-12, p.623-34, 2005.

WU, R.S.S. Ecotoxicology: an emerging tool for coastal management Proceedings of International Symposium on Water Pollution Control, 2-6 November 1999, Nanjing University, Nanjing, China, 1999.

YANG, R.; RANDALL, D. J. Oxygen Consumption of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Sublethal Concentrations of 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene and Tetrachloroguaiacol. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, p.479-85, 1997.

YANG, Y.; XIE, S.; CUI, Y.; LEI, W.; ZHU, X.; YANG, Y.; YU, Y. Effect of replacement of dietary fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal on growth and feed utilization of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.289–294, 2004.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v.54, p.176-86 2001.

ZHANG, H.; DAVISON, W.; KNIGHT, B.; MCGRATH, S. In situ measurements of solution concentration and fluxes of trace metals in soils using DGT. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 704-710, 1998.

4 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL EM RIACHOS NEOTROPICAIS: ESTUDO DE CASO DE MANANCIAIS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

RESUMO

Realizar estudo comparativo de aspectos funcionais e estruturais de microbacias hidrográficas (rio dos Índios, ribeirão Bolivar e rio Ligeiro) localizadas na região noroeste do estado do Paraná por meio da aplicação de protocolo de avaliação rápida (PAR). O protocolo possibilitou a caracterização do estado de conservação utilizando como critério nove parâmetros: substrato de fundo, complexidade do *habitat* submerso, variação de velocidade e profundidade, sinuosidade do canal, condições de escoamento do canal, alterações no canal, estabilidade dos barrancos, proteção vegetal das margens e cobertura vegetal original das margens. Alterações nos atributos físicos dos *habitats* foram identificadas por meio do PAR, permitindo concluir que o trecho do rio dos Índios (referencial), inserido na Unidade de Conservação Reserva Biológica das Perobas, apresentou condição melhor de preservação. A conservação dos trechos avaliados do Bolivar e Ligeiro, com relação a maioria dos atributos contidos no protocolo, foram similares ao ponto referencial. No entanto, por se tratarem de mananciais de abastecimento público atual e futuro, respectivamente, ambos localizados próximos a região de expansão urbana e agrícola, merecem total atenção uma vez que estas áreas são críticas para um impacto mais significativo. As informações obtidas por meio do protocolo podem ser utilizadas para sensibilização da população regional e, por identificar aspectos ecológicos e de conservação, podem auxiliar programas de preservação aos recursos hídricos das microbacias em questão.

Palavras-chave: Recurso hídrico. Impacto. Monitoramento.

4.1 INTRODUÇÃO

Os ambientes lóticos, nas últimas décadas, têm sofrido considerável redução da qualidade dos seus recursos em decorrência de impactos antrópicos. As principais modificações estão associadas a urbanização e exploração do solo. Em muitos casos, as intervenções que ignoram os processos ecossistêmicos acabam por reduzir substancialmente a capacidade de renovação da água dos rios e aquíferos em termos de quantidade e qualidade (Matheus e Tundisi, 1988; Cunha, 2001; Tundisi; Matsumura-Tundisi, 2008).

Com a exploração intensificada dos recursos hídricos, cresce também a necessidade de monitorar a sua qualidade (Rodrigues e Castro, 2008). A identificação das alterações em macro

escala e a compreensão dos processos envolvidos na mudança das características dos *habitats*, constituem etapa fundamental em programas de monitoramento (Moreno e Callisto, 2006). Objetivando aumentar a eficiência dos sistemas de detecção de impactos ambientais, abordagens qualitativas estão sendo empregadas em conjunto com métodos quantitativos. O uso combinado destas ferramentas permite detectar as causas e avaliar os efeitos de estressores sobre os ecossistemas aquáticos (Buss et al., 2008).

Os métodos propostos para diagnóstico ambiental, como os protocolos de avaliação rápida (PAR), precedem ações voltadas para preservação e recuperação dos ecossistemas de rios e riachos. Estes protocolos foram elaborados levando em consideração a visão integrada da qualidade de água, permitindo análises visuais dos níveis de impactos antrópicos em trechos de bacias hidrográficas, abrangendo o corpo hídrico e o ambiente adjacente ao longo de seu curso (Minatti Ferreira e Beaumord, 2004). A análise tem como base parâmetros de fácil entendimento que possibilitem sua utilização de forma simplificada, sem, no entanto, privar os estudos de rigor técnico-científico (Silveira, 2004).

Os PARs surgiram em meados da década de 1980 nos Estados Unidos. Devido ao custo elevado e demora das pesquisas quantitativas, percebeu-se a necessidade de estabelecer métodos de avaliação qualitativas. Os primeiros PARs foram adequados para fornecer dados básicos sobre a vida aquática, para fins de qualidade da água e gerenciamento de recursos hídricos (Rodrigues e Castro, 2008).

A avaliação da estrutura e do funcionamento dos ambientes lóticos, por meio do PAR, contribui com o manejo e a conservação dos ecossistemas aquáticos (Callisto et al., 2002). Essas avaliações, aliadas aos resultados das tradicionais análises de qualidade da água, conferem um caráter holístico aos estudos de monitoramento ambiental (Rodrigues e Castro, 2008).

Para uma abordagem mais eficiente, PARs são elaborados e adaptados de acordo com as características fisiográficas de um local, que é denominado “ecorregião”. Este termo é amplamente empregado em países que utilizam o PAR em programas de monitoramento da qualidade da água, e engloba características inerentes a cada localidade como a geologia, tipo de solo, vegetação natural potencial e uso da terra (Galdean et al., 2000; Cionek et al., 2011), baseado no princípio de que as comunidades biológicas dentro de uma região homogênea são similares (Omernik, 1987; Whittier et al., 1988). No Brasil, os protocolos são desenvolvidos considerando também as características da água e sedimento juntamente com o tipo de ocupação das margens, extensão da mata ciliar e outros aspectos pertinentes a cada manancial (Callisto et al., 2002). A escolha dos parâmetros a serem analisados em cada protocolo

particular irá depender principalmente da proposta de monitoramento a ser seguida (Barbour et al., 1999).

A bacia do rio Ivaí é responsável pela drenagem de uma área de 35.845 km² que abrange vários municípios, entre eles o de Cianorte - Paraná. Devido ao rápido desenvolvimento a partir da década de 1950, que ocasionou um intenso desmatamento, e a consequente ocupação da área para a construção de cidades e para cultivo e pastoreio, ocorreram alterações que se refletem na degradação dos recursos hídricos da região. A planície do rio é primeiramente utilizada para a pecuária e para o cultivo de cana de açúcar e secundariamente para o cultivo de milho e soja (Santos et al., 2008).

O município de Cianorte detém uma rica rede hidrográfica e apresenta várias microbacias dentro do seu território com distintos níveis de alterações antrópicas. De acordo com a Agência Nacional de Águas (2014), o município possui 74% do seu abastecimento suprido pelo ribeirão Bolivar e 24% por um conjunto de poços artesianos (mananciais subterrâneos). Ambos os sistemas de captação de água necessitam ser ampliados. A ampliação requer uma investigação pormenorizada com relação aos seus corpos hídricos levando em consideração a expansão urbana em direção as reservas florestais e aos mananciais da região (Baldo e Silveira, 2009).

Avaliou-se trechos diferentes em três rios situados na Região Noroeste do Paraná, Município de Cianorte, por meio do PAR de Cionek et al., (2011) adaptado ao arenito Caiuá. A utilização do PAR visou complementar os resultados obtidos por parâmetros físicos, químicos e biológicos, acreditando assim que a análise integrada desses resultados disponibilizará informações relevantes sobre a qualidade dos recursos hídricos dos mananciais avaliados neste trabalho. Estas informações também fundamentarão a escolha de um novo manancial de abastecimento público para o município de Cianorte.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da área de estudo

O município de Cianorte está localizado entre as coordenadas geográficas de 52° 35' de longitude Oeste e 23° 40' de latitude Sul (Figura 1.A), e está inserido na Mesorregião Noroeste Paranaense (precisamente na microrregião que recebe o seu nome), da qual fazem parte as microrregiões de Paranaíba e Umuarama. O município está inserido no Terceiro Planalto

Paranaense, mais especificamente no Planalto de Campo Mourão, de acordo com a subdivisão proposta por Maack (2002).

Cianorte está na divisa entre as bacias hidrográficas do rio Ivaí e do rio Piquiri. Ambos os rios são afluentes da margem esquerda do rio Paraná. O rio Ivaí percorre um trecho de 685 km, desde a sua nascente até a foz, no rio Paraná. Dois subsistemas da bacia do Ivaí estão em território cianortense: o rio Ligeiro (com 51.850 metros de extensão e 24 afluentes) e rio dos Índios (com 47.280 metros de extensão e 22 afluentes).

O ribeirão Bolivar está inserido na bacia hidrográfica do rio dos Índios, possui extensão total de aproximadamente 14.750 metros até sua confluência com o Rio dos Índios; possui 11 afluentes e sua água é captada para tratamento e abastecimento público de Cianorte. A bacia do rio Ligeiro, no noroeste do estado do Paraná, possui área de aproximadamente 775 km² (24°00' 23°30' S/ 52°20' 52° 42' O) (Marcotti e Marcotti, 2011) o rio percorre aproximadamente 82 km até desaguar como afluente da margem esquerda do rio Ivaí e suas nascentes surgem próximas às cidades de Campo Mourão e Araruna (Destefani, 2005).

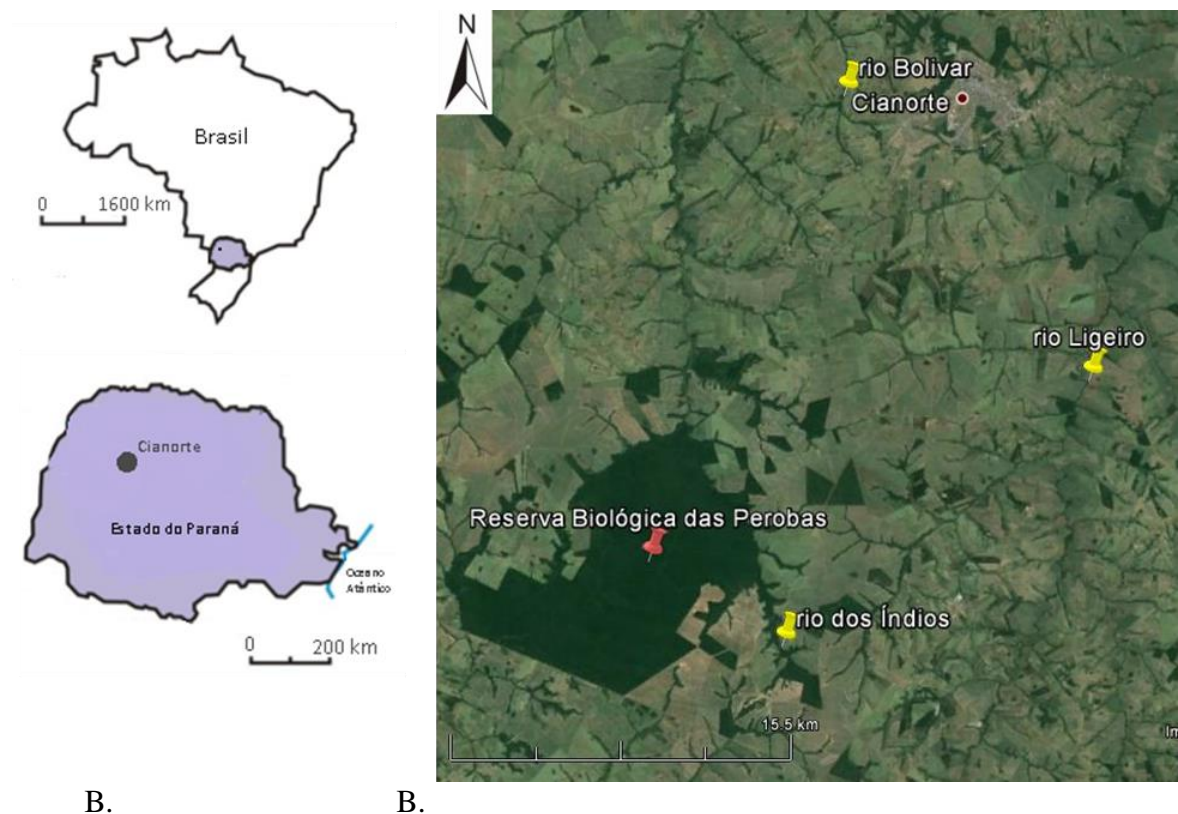


Figura 1. A. Localização geográfica do município de Cianorte, Leli et al. (2010) com modificações. B. Localização dos rios avaliados: Bolivar (L1), Ligeiro (L2) e dos Índios (REF) (Google Earth, 2015).

Na região predomina a Floresta Estacional Semidecidual. Esse tipo de mata tem ocorrência na área dominada pelo clima Cfa, segundo a classificação de Köppen, e apresenta características tropicais aparentando-se menos exuberante por se desenvolver em solos mais arenosos na área de ocorrência da Formação Caiuá (Maack, 2002).

O rio dos Índios passa dentro da Reserva Biológica das Perobas, é um dos principais afluentes da margem esquerda do Ivaí. A Reserva é uma Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral da Natureza sob jurisdição federal. É representativa de ambientes florestais da Mata Atlântica, bioma que tem apenas 4,3% do território que é protegido por Reservas Biológicas Federais. Sua zona de amortecimento ocupa um território de 8.716 hectares que abrange parte dos municípios de Tuneiras do Oeste e Cianorte, no norte do Estado do Paraná, coordenadas geográficas 23°51'S / 52°45'O. A Unidade está inserida no divisor de águas das bacias dos rios Ivaí e Piquiri, afluentes da margem esquerda do trecho alto do rio Paraná. Constitui a maior área de floresta remanescente das regiões norte e noroeste do Estado do Paraná. Está presente em área de transição entre as fitofisionomias Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Mista (Brasília, 2010).

4.2.2 Protocolo de avaliação rápida

O PAR utilizado foi desenvolvido com base na metodologia estabelecida por Barbour et al. (1999) com adaptações para o Arenito Caiuá (Cionek et al., 2011). Os parâmetros avaliados representam o *habitat* físico, sua relevância para a biota aquática e a interpretação dos elementos que o compõem. Considerando que a região é caracterizada por feições planas e homogêneas, o protocolo foi adaptado para avaliação de riachos considerados de “baixo curso”. Nove parâmetros ambientais foram avaliados: substrato de fundo, complexidade do *habitat* submerso, variação de velocidade e profundidade, sinuosidade do canal, condições de escoamento do canal, alterações no canal, estabilidade dos barrancos, proteção vegetal das margens e cobertura vegetal original das margens.

A cada parâmetro foi atribuído um gradiente de estresse, classificado em quatro categorias: “ótima” (nota 16 a 20), “boa” (nota 11 a 15), “regular” (nota 6 a 10) e “péssima” (nota 0 a 5). As notas são dadas a partir da inspeção visual da condição física do ambiente avaliado e o valor final do protocolo é obtido a partir da somatória das notas atribuídas a cada parâmetro, que então, reflete o estado de conservação do trecho analisado (Tabela 1).

A aplicação do PAR foi realizada em 3 trechos de cada rio, Bolivar, Ligeiro e Índios (Reserva das Perobas) (Figura 1). Os critérios utilizados para seleção dos trechos analisados basearam-se nas características ecomorfológicas dos cursos de água condizentes com os parâmetros propostos no PAR utilizado, bem como a acessibilidade aos trechos escolhidos. Para cada trecho, o PAR foi aplicado por dois diferentes avaliadores previamente treinados, no período de agosto a setembro de 2012, estação de estiagem.

Todos os dados foram submetidos à análise estatística de variância ANOVA para identificação de possíveis diferenças entre os parâmetros e entre os três rios avaliados.

Tabela 1. Amplitude da somatória das notas correspondentes à avaliação das diferentes condições de conservação do trecho do ambiente analisado.

Condição de Conservação	Notas
Ótima	136 a 180
Boa	91 a 135
Regular	46 a 90
Péssima	0 a 45

Fonte: Cionek et al. (2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os ambientes avaliados o rio dos Índios foi caracterizado como de condição “ótima” de conservação e os trechos dos rios Bolivar e Ligeiro foram classificados como de condição “boa” de conservação (Figura 2). Os ambientes não apresentaram diferenças significativas na análise da comparação das médias para cada parâmetro individualmente (Figura 3).

Por meio da análise geral (todos os trechos avaliados) (Figura 2) foram observadas condições de conservação mais elevadas nos seis primeiros parâmetros (“bom” e “ótimo” estado de conservação), e uma diminuição nos três últimos. Ao rio dos Índios e Bolivar atribuiu-se condição “regular” na média final para o atributo “alteração no canal”. O rio Ligeiro apresentou “bom” estado de conservação em todos os parâmetros avaliados.

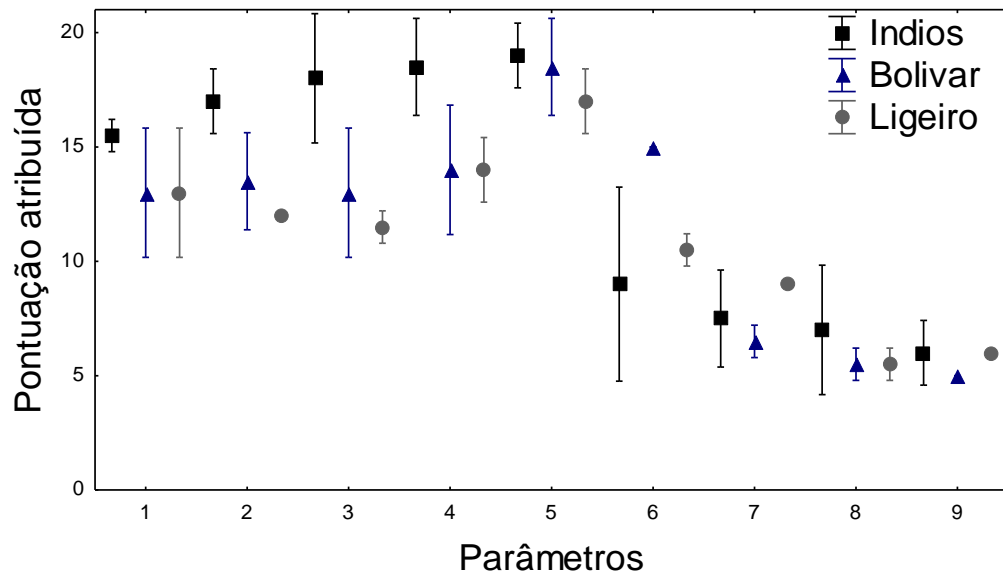


Figura 2. Resultados da avaliação dos trechos de rios relativa aos parâmetros: 1: “Substrato de fundo”- 2: “Complexidade do *habitat* submerso”- 3: “Variação de velocidade e profundidade”- 4: “Sinuosidade do canal”- 5b (período de estiagem: compreendido entre os meses de abril a setembro): “Condições de escoamento do canal”- 6: “Alterações no canal”- 7: “Estabilidade dos barrancos”- 8 “Proteção vegetal original das margens”- 9: “Cobertura vegetal original das margens”. Os pontos no gráfico representam a média +/- desvio padrão das pontuações atribuídas a cada parâmetro (n=6).

As menores pontuações (Tabela 2) foram observadas nos parâmetros 7 (“Estabilidade dos barrancos”), 8 (“Proteção vegetal das margens”), 9 (“Cobertura vegetal original das margens”), porém, ainda dentro da categoria “boa” condição de conservação e nenhum parâmetro obteve “péssimo” estado de conservação.

Tabela 2. Médias das notas atribuídas aos parâmetros propostos pelo PAR na avaliação das diferentes condições de conservação dos riachos estudados. Escore final e condição de conservação dos ambientes.

Parâmetros		Rio dos Índios	Bolivar	Ligeiro
1. Substrato de Fundo		15,5	13	13
2. Complexidade do <i>Habitat</i> Submerso		17	12	13,5
3. Variações de velocidade e profundidade		18	13	13
4. Sinuosidade do canal		18,5	14	14
5. Condição de escoamento do canal		19	17	18,5
6. Alterações no canal		9	10,5	15
7. Estabilidade dos barrancos	ME	5,5	9	6,5
	MD	9	9	7
8. Proteção vegetal das margens	ME	5	5	6
	MD	9	6	6
9. Estado de Conservação da Vegetação de Entorno	ME	5	6	6
	MD	7	6	6
Escore final		137,5	120,5	124,5
Condição de conservação		Ótimo	Bom	Bom

ME = margem esquerda; MD = margem direita (n=6).

Os atributos que contribuíram para a condição “ótima” dos trechos avaliados no rio dos Índios foram a “complexidade do *habitat* submerso”, “variação da velocidade e profundidade” e “sinuosidade do canal” (Figura 3). Para os mesmos parâmetros, observou-se um menor grau de conservação nos rios Bolivar e Ligeiro, porém ainda dentro da categoria “boa”. De acordo com Plafkin et al. (1989) locais minimamente perturbados fornecem limites que podem ser tomados como referenciais. Portanto, estes resultados justificam a escolha do rio dos Índios como local “referência”.

A maior diversificação dos *habitats* ao longo do canal disponibiliza refúgio, alimento e locais de desova para a biota aquática (Callisto et al., 2002). Estas condições são ideais para a manutenção dos ecossistemas aquáticos (Rodrigues et al., 2008) e aumento da diversidade biológica (Barrela et al., 2001).

O aspecto que contribui para os bons resultados observados nestes parâmetros pode estar relacionado à ordem dos rios. Os trechos avaliados localizam-se em alto curso. O estresse hidráulico, devido a velocidade, profundidade e sinuosidade do canal é menor em nascentes e cabeceiras. Este fator contribui para alta variabilidade de micro-habitats disponíveis para a biota. Mudanças antropogênicas que alteram os regimes de descarga e fluxo (como por exemplo, as represas e as usinas hidrelétricas), alteram as comunidades, pois diminui

consideravelmente a habilidade de recuperação da biota frente as mudanças do ambiente físico (Ward e Stanford, 1982).

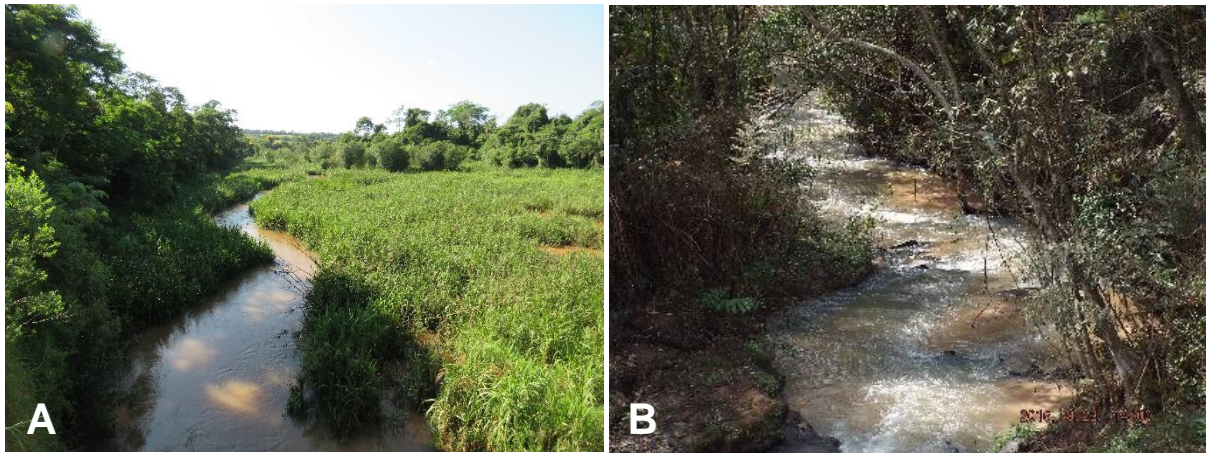


Figura 3. As imagens ilustram: Sinuosidade do canal, complexidade do *habitat* submerso, velocidade e profundidade do canal. **A.** Índios; **B.** Bolivar.

O solo originado da formação Caiuá apresenta suscetibilidade relativamente alta à erosão hídrica. Além disso, a associação desta classe de solo com a maior inclinação do relevo nas porções mais baixas dos vales cria condições de maior risco de erosão e consequente assoreamento de cursos de água (Brasília, 2012).

Os processos erosivos nos rios e riachos reduzem a complexidade do *habitat* submerso e diminuem a variação da velocidade e da profundidade dos canais. Estas alterações, quando frequentes, selecionam espécies mais resistentes e adaptadas ao substrato arenoso, que acabam se tornando dominantes. Dessa forma a diversidade local fica reduzida (Ramalho et al., 2014). O parâmetro relativo a estas condições (estabilidade dos barrancos) obteve avaliação dentro da categoria “boa” para os rios Índios e Ligeiro, e “ótimo” para o rio Bolivar.

Estes resultados corroboram os obtidos para o Plano de Manejo da Reserva Biológica das Perobas (Brasília, 2012), por meio do PAR da diversidade de *habitats* adaptado de Callisto et al. (2002). Em um trecho do rio dos Índios, no interior da Reserva, as características avaliadas relativas a conservação das margens como, ocupação, presença de erosão e assoreamento e extensão da mata ciliar, também foram consideradas em bom estado de conservação.

A cobertura vegetal da região do Arenito Caiuá equilibra os processos de transformação do solo e são fundamentais para conter os processos erosivos. Em áreas de cultivo localizados em cabeceiras de drenagem, os materiais remobilizados são carreados pelas águas pluviais sendo que na ausência de vegetação, os cursos de água são assoreados, e o problema se estende a jusante (Souza et al., 2008). Dessa forma, a integridade da vegetação ripária se torna ainda mais importante em região de solo arenoso, pois contribui essencialmente para as melhores

condições de conservação das características geomorfológicas e hidrológicas das bacias hidrográficas.

Os ambientes avaliados apresentam condições ecológicas distintas e variação nas composições florísticas das matas em função das atividades predominantemente agrícolas no entorno dos rios. Os aspectos contemplados dentro das categorias dos parâmetros “proteção vegetal das margens” e “cobertura vegetal original das margens” (Figura 4) abrange a totalidade da extensão da cobertura vegetal e o espaço cedido a atividades desenvolvidas próximas às margens, como áreas de cultivo, pastagens e/ou urbanização. Portanto os resultados obtidos neste protocolo representam as condições dos trechos estudados, o que não engloba todo o seu curso, sendo que alguns trechos deste rio apresentam interferências antrópicas.



Figura 4. As imagens ilustram cobertura vegetal das margens. **A.**Bolívar; **B.**Ligeiro.

Os atributos vegetacionais em bacias com solo arenoso representam um bom indicador das condições de conservação dos rios para a biota aquática. Algumas relações funcionais existentes entre as florestas ripárias e os organismos aquáticos são essenciais para garantir sua sobrevivência. Estas relações envolvem a transferência de energia solar ao corpo hídrico, interceptação de nutrientes e sedimentos que adentram nos rios e trocas de material orgânico entre o sistema terrestre e aquático (Pusey e Arthington 2003).

Os problemas associados ao processo de erosão hídrica também são minimizados pela dinâmica da Floresta Estacional Semidecidual, na região dos rios estudados. A perda de 30 a 50% das folhas dos indivíduos no inverno por conta da seca fisiológica deste período, além de galhos e troncos, fornecem abrigo às comunidades aquáticas que estão aptas a sobreviver e se desenvolver nessas condições (Cionek et al., 2011), substituindo a presença de cascalhos, pedregulhos e seixos que possuem tal função, mas que são raros na região do arenito Caiuá.

No parâmetro “estabilidade dos barrancos” (Figura 5 C e D) o rio Bolivar obteve avaliação “ótima” e os rios Índios e Ligeiro “boa”. Este resultado confirma a melhor estrutura e conservação do solo e da água ao longo do trecho avaliado nas microbacias. A avaliação deste parâmetro é realizada separadamente nas margens esquerda e direita, e está estreitamente associada à presença de vegetação enraizada, ou mesmo da serrapilheira (Figueiredo Filho et al., 2003). De acordo com Cionek et al. (2011), entende-se como barranco o trecho de solo imediatamente adjacente ao corpo aquático estudado, sem levar em conta a ocupação do solo das áreas do entorno.

O atributo considerado regular (alteração do canal) para o rio dos Índios e Bolivar deve-se em partes a presença de tubulações, estradas e pontes (Figura 5 A e B). Estes rios percorrem várias cidades e vilarejos sendo natural intervenções dessa natureza ao longo do percurso do rio. No entanto, por se tratar de áreas preservadas, esse tipo de intervenção facilita o acesso aos rios e a mata, sujeitando estes ambientes a outros estressores ambientais, o que pode comprometer no futuro seu valor referencial (Brasília, 2012).



Figura 5. As imagens ilustram: **A e B.** Alteração do canal no rio Bolivar (tubulação impedindo o fluxo normal) e no Índios (ponte). Estabilidade dos barrancos: **C.** Bolivar; **D.** Índios.

A condição regular observada no rio dos Índios é um alerta para o maior nível de interferência e seus efeitos sobre os ecossistemas aquáticos, que *a priori* devem ser integralmente protegidos. Os trechos que se encontram sobre diferentes influências antrópicas estão localizados próximo a cabeceira e na zona de amortecimento da reserva biológica. O acesso do gado para dessedentação em alguns pontos e trechos propensos a erosão, foram relatados como atividades impactantes deste rio (Brasília, 2012).

As Reservas Biológicas de Proteção Integral são os componentes mais restritivos do Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza (SNUC), sendo admitido apenas o uso indireto dos seus recursos naturais. Em termos de uso, objetivam principalmente a preservação integral da diversidade biológica e dos demais atributos naturais inseridos no seu limite sem interferência humana direta. Apenas é permitido intervir com medidas de recuperação de seus ecossistemas alterados e ações de manejo necessárias para preservar o equilíbrio natural, a diversidade biológica e os processos ecológicos naturais (Brasília, 2012).

As unidades de conservação não são “ilhas de preservação” isoladas do seu contexto regional e nacional (Fernandez, 1997), mas normalmente os corpos hídricos inseridos nestas unidades obtêm pontuações mais elevadas em parâmetros equivalentes aos deste protocolo em outros estudos (Vestena e Thomaz, 2006; Paz et al., 2008; Rodrigues et al., 2008). Portanto, as informações geradas servem para demonstrar que há necessidade de implantar medidas afim de restabelecer as condições naturais nos locais que apresentaram alterações no rio dos Índios.

Com relação ao rio Bolivar, por se tratar de um manancial de abastecimento público, todos os seus atributos físicos, incluindo margens e o canal do rio, devem ser preservados visando assegurar a qualidade e quantidade da água em condições adequadas para a captação. Estas condições são previstas na Lei Federal nº 6.902/81 (Brasil, 1981), a qual institui as Áreas de Proteção Ambiental e seus objetivos. O Artigo. 9º desta lei, estabelece normas que limitam e proíbem, dentre elas “a realização de obras de terraplanagem e a abertura de canais, quando essas iniciativas importarem em sensível alteração das condições ecológicas locais”.

A alteração do canal, parâmetro considerado regular para o trecho avaliado deste rio, pode provocar mudança no curso natural da água, dificultando e até mesmo impedindo a estabilização e manutenção do equilíbrio ambiental (Araújo et al., 2009). Apesar da proteção que é legalmente assegurada para estes ambientes, encontra-se na literatura relatos de atividades impactantes na microbacia deste rio, como a criação extensiva de gado no alto curso e até mesmo indicação para implantação de microcentrais hidrelétricas (Batista et al., 2014). A maioria dos rios avaliados por protocolos, situados em áreas urbanas sob influência de

atividades antrópicas, apresentaram progressiva deterioração de sua qualidade (Vieira e Shibatta, 2007; Krupek, 2010; Firminino et al., 2011; Vargas e Ferreira Júnior, 2012).

A qualidade e quantidade da água de um ecossistema aquático “saudável” é mantido por determinadas características ecológicas bem desenvolvidas, como, por exemplo, uma comunidade diversificada, com forte interação entre os organismos, cadeia alimentar extensa, ciclagem completa dos elementos (o material que é eliminado por um organismo é imediatamente assimilado por outro) e um equilíbrio nas atividades de produção e respiração (Hannaford et al., 1997). Qualquer alteração ou limitação destas características pode ser percebida por organismos mais sensíveis, causando prejuízos que pode se estender a toda a cadeia biológica.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os protocolos para avaliação rápida constituem importantes ferramentas na identificação de alterações em pequena e larga escala, em ecossistemas aquáticos. O PAR utilizado por este trabalho possibilitou verificar que, por meio de determinados parâmetros, o trecho do rio dos Índios dentro da Reserva das Perobas possui grande valor como área comparativa (“referência”) para este e futuros estudos de monitoramento ambiental. Entretanto ainda existem aspectos a serem melhorados, como por exemplo àqueles incluídos nos objetivos das UCs, como a preservação integral dos atributos naturais existentes em seus limites.

Os rios Bolivar e Ligeiro possuem características similares as condições observadas no ponto referencial, que indicam o seu bom estado de conservação com relação aos atributos contidos no protocolo. No entanto, por se tratarem de mananciais de abastecimento público atual e futuro, respectivamente, ambos localizados próximos a região de expansão urbana e agrícola, merecem total atenção uma vez que estas regiões são críticas para um impacto mais significativo.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Atlas Brasil, Abastecimento Urbano de Água. Resultados por município. Município de Cianorte. Disponível em: < <http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/Resultados.aspx> > Acesso em: 4 de jul. 2014.
- ARAÚJO, E. P.; TELES, M. G. L.; LAGO, W. J. S. Delimitação das bacias hidrográficas da Ilha do Maranhão a partir de dados SRTM. In: Simpósio Brasileiro de sensoriamento remoto, XIV, 2009, Natal. Anais... Natal: 2009. p. 4631-4638.
- BALDO, M. C.; SILVEIRA, H. A contribuição dos estudos climáticos para o Plano de Manejo do Parque Municipal Cinturão Verde, Cianorte-PR. In: XIII Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada: A Geografia Física Aplicada e as dinâmicas de apropriação da Natureza – Universidade Feral de Viçosa-MG, 2009.
- BARBOUR, M. T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B. D. & STRIBLING, J. B. **Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish**. 2nd Ed. Washington, DC: Environmental Protection Agency. 1999.
- BARRELA, W.; PETRERE Jr. M.; SMITH, W.S.; MONTAG, L.F. **As relações entre as matas ciliares, os rios e os peixes. In Matas ciliares: conservação e recuperação** (R.R. Rodrigues & H.F. Leitão Filho, ed.). EDUSP, FAPESP, São Paulo, p.187-207, 2001.
- BATISTA, A. C.; SOUZA, F. M. de; RALISCH, R. Avaliação da implantação de microcentrais hidrelétricas na região de Cianorte/pr. In: II Simpósio de bioenergia e biocombustível do Mercosul, 25 e 26 de set. 2014, Foz do Iguaçu, 2014.
- BRASIL. Lei nº 6.902, de 27 de abril de 1981.
- BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011.
- BRASÍLIA. Plano de Manejo da Reserva Biológica das Perobas. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, 2012.
- BUSS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BAPTISTA, D. F. “Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais”. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 339-345, 2008.
- CALLISTO, M.; FERREIRA, W.R.; MORENO, P.; GOULART, M.; PETRUCIO, M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 14, n. 1, p. 91-98, 2002.
- CIONEK, V de M; BEAUMORD, A. C.; BENEDITO, E. **Protocolo de Avaliação Rápida do Ambiente para Riachos Inseridos na Região do Arenito Caiuá – Noroeste do Paraná**. Coleção Fundamentum. N. 72. 47p. Maringá 2011.
- CUNHA, A. C. Levantamento de parâmetros físico-químicos e hidráulicos para a avaliação da qualidade da água em escoamentos naturais – desenvolvimento do distrito industrial/AP na Bacia do Rio Matapi. Relatório Anual. Macapá: CNPq/IEPA/Gerco, 58p, 2001.
- DESTEFANI, E. V. **Regime hidrológico do rio Ivaí – PR**. 95f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Estadual de Maringá, 2005.

- FERNANDEZ, F. A. S. Efeitos da fragmentação de ecossistemas: a situação das Unidades de Conservação. In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, 1, 1997,
- FIGUEIREDO FILHO, A.; MORAES, G.F.; SCHAAF, L.B.; FIGUEIREDO, D.J. Avaliação estacional da deposição de serapilheira em uma floresta ombrófila mista localizada no sul do Estado do Paraná. **Ciência Florestal**, v.13, p.11-18, 2003.
- FIRMINO, P. F.; MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. Diagnóstico da integridade ambiental de trechos de rios localizados no município de Ipameri, Sudeste do estado de Goiás, através de um protocolo de avaliação rápida. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v.15, p.1-12, 2011.
- GALDEAN, N.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F.A.R.; ROCHA, L.A. Lotic ecosystems of Serra do Cipó, southeast Brazil: water quality and a tentative classifications base don the benthic macroinvertebrate community. **Aquatic Ecosystem Health & Management**. v.3, p.545-552, 2000.
- GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: Galindo-Leal, C.; Câmara, I.G. (Eds.). 2005. **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Fundação SOS Mata Atlântica e Conservação Internacional, Belo Horizonte, 472 p. 2005.
- HANNAFORD, M. J; BARBOUR, M. T.; RESH, V. H. Training reduces observer variability in visual-based assessments of stream habitat. **Journal North American Benthol. Soc.**, v.16, p.853-860, 1997.
- KRUPEK, R. A. Análise comparativa entre duas bacias hidrográficas utilizando um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.6, p. 147-158, 2010.
- LELI, I. T.; STEVAUX, J. C.; NÓBREGA, M. T. DA. Dinâmica espacial da hidrologia da bacia do rio Ivaí. **Boletim geografia**, Maringá, v. 28, p. 41-47, 2010
- MAACK, H. **Geografia física do Paraná**. Secretaria da Cultura e do Esporte do Governo do Estado do Paraná. Ed. José Olimpo S.A., 450p, 2002.
- MARCOTTI, A.R.; MARCOTTI, T.C.B. Contribuições de estudos geográficos para a análise dos atrativos turísticos no rio Ligeiro – PR. In: Encontro Paranaense de Pesquisa e Extensão em Ciências Sociais Aplicadas, 7, 2011, Campo Mourão, **Anais...** Campo Mourão: Fecilcam, 2011, CD-ROM.
- MATHEUS, C.E.; TUNDISI, J.G. Estudo físico químico e ecológico dos rios da bacia hidrográfica do Ribeirão e represa do Lobo. In **Limnologia e Ecologia de Represas**. (J.G. Tundisi, ed.). ACIESP; FAPESP; CNPq; UNEP; UNCRD, v.1, tomo 1, p.419-472. Série Monografias em Limnologia, 1988.
- MINATTI-FERREIRA, D. D.; BEAUMORD, A. C. Avaliação rápida de integridade ambiental das sub-bacias do rio Itajaí-Mirim no Município de Brusque, SC. **Health and Environmental Journal**, v. 4, p. 21-27, 2004.
- MORENO, P.; CALLISTO, M. Benthic macroinvertebrates in the watershed of an urban reservoir in southeastern Brazil. **Hydrobiologia**, v.560, p.311-321, 2006.
- NUNES, A. N.; ALMEIDA, A. C.; COELHO, C. O. A. Impacts of land use and cover type on runoff and soil erosion in a marginal area of Portugal. **Applied Geography**, v.31. p. 687-699, 2011.

- OMERNIK, J. M. Ecoregions of conterminous United States. **Annals of the Association of American Geographers**, v.77, p.118-125, 1987.
- PAZ, A.; MORENO, P.; ROCHA, L.; CALLISTO, M. Efetividade de Áreas Protegidas na conservação da qualidade das águas e biodiversidade aquática em sub-bacias de referência no Rio das Velhas (MG). **Neotropical Biology and Conservation** v.3, p.149-158, 2008.
- PLAFKIN, J. L.; BARBOUR, M. T.; PORTER, K. D.; GROSS, S. K. & HUGHES, R. M. **Rapid Bioassessment Protocols for use in Streams and Rivers: Benthic Macroinvertebrates and Fish**. Washington, DC: Environmental Protection Agency. 1989.
- PUSEY, B. J.; ARTHINGTON, A. H. Importance of the riparian zone to the conservation and management of freshwater fish: a review. **Marine and Freshwater Research**. v.54, p.1-16, 2003.
- RAMALHO, W.; SUSÇUARANA, M.; LÓPEZ-ROJAS, J.; ROCHA, L.; KEPPELER, E. C.; VIEIRA, L. Impacto do assoreamento sobre a diversidade de peixes em igarapés de um complexo vegetacional de campinarana no noroeste do Acre, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v.9, n.2, p.105-114, 2014.
- RODRIGUES, A. S. DE L., MALAFAIA, G.; CASTRO, P. DE T. A. Avaliação ambiental de trechos de rios na região de Ouro Preto-MG através de um protocolo de avaliação rápida. **Revista de estudos ambientais**, v.10, p.74-83, 2008.
- RODRIGUES, A. S. L. **Adequação de um protocolo de avaliação rápida para o monitoramento e avaliação ambiental de cursos d'água inseridos em campos rupestres**. 2008. 146 f. (Mestrado em Ciências Naturais) - Programa de Pós - Graduação em Evolução Crustal e Recursos Naturais, Departamento de Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.
- RODRIGUES, A. S. L.; CASTRO, P. T. A. Adaptation of a rapid assessment protocol for rivers on rocky meadows. **Acta Limnologica Brasiliense**, Sorocaba, v. 20, n. 4, p. 2, 2008.
- RODRIGUES, A. S. L.; CASTRO, P. T. A.; MALAFAIA, G. Utilização dos protocolos de avaliação rápida de rios como instrumentos complementares na gestão de bacias hidrográficas envolvendo aspectos da geomorfologia fluvial: uma breve discussão. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, p. 1-9, 2010.
- SANTOS, M. L.; STEVAUX, J. C.; GASPARETTO, N. V. L.; SOUZA FILHO, E. E. DE. Geologia e Geomorfologia da Planície Aluvial do Rio Ivaí em seu Curso Inferior. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, v.9, p.23-34, 2008.
- SILVEIRA, M. P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios**. Embrapa Meio Ambiente, 2004. 68 p.
- SOUZA, M. L.de; GASPARETTO, N. V. L.; NAKASHIMA, P. Diagnóstico geoambiental da bacia do córrego Tenente em Mariluz, Paraná, Brasil. **Revista brasileira de geociências**, São Paulo, v. 38, 2008 .
- SOUZA, N. L.; DE ANGELIS, B. L. D. Parque municipal cinturão verde de Cianorte – módulo Mandhuy e os principais impactos da área de entorno. **Revista GEOMAE** , v. 02, 2011.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 631p. 2008.

TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.M. Potencial impacts of changes in the Forest Law in relation to water resources. **Biota Neotropica**, v.10, 2010.

VARGAS, J. R. A.; FERREIRA JÚNIOR, P. D. Aplicação de um Protocolo de Avaliação Rápida na Caracterização da Qualidade Ambiental de Duas Microbacias do Rio Guandu, Afonso Cláudio, ES. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.17, p.161-168, 2012.

VESTENA, L. R.; THOMAZ, E. L. Avaliação de conflitos entre áreas de preservação permanentes associadas aos cursos fluviais e o uso da terra na bacia do Rio das Pedras. **Ambiência Guarapuava**, v. 2, p. 73-85, 2006.

VIEIRA, D. B.; SHIBATTA, O. A. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v7, 2007.

WARD, J.V.; STANFORD J. A. The serial discontinuity concept of lotic ecosystems. In: Fontaine, T. D.; Bartell, S.M. (eds). **Dynamics of Lotic Ecosystems**. Ann Arbor Sci. Publ., Ann. Arbor, Michigan, 29-42, 1982.

WHITTIER, T. R.; HUGUES, R. M.; LARSEN, D. P. Correspondence between ecoregions and spatial patterns in stream ecosystem in Oregon. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.45, p.1264-1278, 1988.

5 OS BIOMARCADORES EM MENORES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO SÃO MAIS SENSÍVEIS À ESTRESSORES AMBIENTAIS DO QUE AQUELES QUE AVALIAM NÍVEIS SUPERIORES?

RESUMO

Estressores aquáticos naturais ou antrópicos podem provocar alterações em peixes, utilizadas como biomarcadores, se refletem na sobrecarga ou limitação dos sistemas fisiológicos, redução do crescimento, prejuízos à reprodução, predisposição à doenças e redução da capacidade de resistência e adaptação a estressores adicionais. Neste trabalho, biomarcadores morfométricos e moleculares foram utilizados em populações de *Astyanax* spp., provenientes de diferentes rios e ribeirões da região sul do Brasil, incluindo um manancial de abastecimento público (ribeirão Bolivar = Local 1), de área não protegida (rio Ligeiro = Local 2) e inserido em uma Unidade de Conservação (rio dos Índios = Referencial - REF). Um método que combina diferentes respostas de biomarcadores em um índice chamado "resposta integrada de biomarcadores" (IBR) também foi aplicado. Os resultados histopatológicos mostraram maior prevalência de alterações moderadas no fígado em relação as brânquias e efeitos tóxicos agudos significativos nas brânquias. Estresse oxidativo (EO) foi verificado pelos níveis de atividade enzimática antioxidante e ensaios genotóxicos, bem como pela quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), liporeroxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO) no fígado dos animais de L1 e L2. As lesões e alterações observadas em *Astyanax* spp. evidenciaram a presença de substâncias e/ou condições ambientais estressantes de forma mais representativa no L2. Os índices somáticos mostraram-se menos sensíveis a estas alterações, pois não apresentaram variações entre os ambientes e nem alterações que indiquem a ocorrência de efeitos adversos sob o estado de saúde geral das populações de peixes. A análise do IBR identificou o L1 com sendo o local de maior similaridade ao ponto REF. A integração multinível de biomarcadores em diferentes níveis da organização biológica possibilitou maior confiabilidade nas interpretações em relação a qualidade dos ecossistemas.

Palavras-chave: biomonitoramento aquático, avaliação ecológica, qualidade de água, estresse oxidativo, toxicologia aquática, pressão antrópica.

5.1 INTRODUÇÃO

Em ecossistemas aquáticos uma mistura de compostos tóxicos e estressores naturais coexiste em diferentes formas, ocorre simultaneamente e sua interação com os sistemas biológicos pode ser aditiva, antagônica ou sinérgica (Lam, 2009). A toxicidade desses contaminantes depende da biodisponibilidade e persistência, da capacidade de bioacumulação e biomagnificação e da interferência em processos biológicos e/ou ecológicos (Van der Oost et

al., 2003). Os poluentes são capazes de induzir alterações e lesões que constituem por vezes respostas adaptativas nos seres vivos, as quais são conhecidas como biomarcadoras (Vasseur e Cossu-Leguille, 2003). Estas se refletem na sobrecarga ou limitação dos sistemas fisiológicos, redução do crescimento, prejuízos à reprodução, predisposição à doenças e redução da capacidade de resistência e adaptação a estressores adicionais (Adams et al., 1993, Eufemia et al., 1997).

O papel primordial de um biomarcador é supostamente fornecer sinais de alerta precoce de mudanças que, geralmente, ocorrem primeiro em baixos níveis da organização biológica. Portanto, pressupõem-se que, a avaliação das respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas possibilite a antecipação de ações e medidas de programas de gestão e conservação dos ambientes (Anzecc, 1992) antes que mudanças alterem fundamentalmente a estrutura e capacidade de sobrevivência das populações e comunidades ou de ecossistemas inteiros (Vasseur e Cossu-Leguille, 2003).

O uso de biomarcadores na avaliação ambiental não pode estar limitado a uma ou poucas métricas, e devem responder ao estresse tóxico com diferentes graus de especificidade. Alguns são altamente específicos; isto é, eles respondem apenas a um composto químico ou grupo de compostos químicos. A maioria dos biomarcadores são menos específicos, mas em geral respondem ao estresse ambiental (Van der Oost et al., 2003).

A aplicação de biomarcadores em multinível vem sendo discutida como um instrumento importante para elevar a sensibilidade na detecção de situações de risco ou fragilidade em potencial (Beroya-Eitner, 2015). A utilização de um conjunto de indicadores ecológicos tem sido incentivada na última década em programas de monitoramento ambiental. A análise integrada, utilizando diferentes biomarcadores e indicadores ecológicos, pode superar a dificuldade de mensurar e relacionar os efeitos de múltiplos estressores (naturais e antrópicos) em diferentes níveis da organização biológica e o meio abiótico (Sanchez e Porcher, 2009; Cortes et al., 2013).

A integração multinível possibilita também maior clareza nas interpretações com relação a qualidade do ecossistema. Esta percepção surgiu justamente de casos em que foi encontrado um acordo total entre as duas respostas, ou seja, em níveis diferentes da organização. Quando ambos os indicadores ecológicos e ecotoxicológicos são bons, há uma confiança maior em concluir que o ecossistema é saudável. Por outro lado, quando ambos os indicadores apontam para alterações em indivíduos e populações, também pode-se chegar à conclusão sobre o grau de impacto ou a péssima qualidade do sistema (Vasseur e Cossu-Leguille, 2003).

Este trabalho propôs avaliar a qualidade da água de riachos neotropicais, com diferentes níveis de interferência antrópica, por meio de um conjunto de biomarcadores englobando diferentes níveis da organização biológica, visando comparar a sensibilidade entre eles, pressupondo que os biomarcadores em níveis menores da organização biológica são mais sensíveis. O biomonitor utilizado foi o *Astyanax* spp. Para determinar a qualidade da água e potencial tóxico foram empregados parâmetros físicos e químicos, métricas populacionais, histopatologia do fígado e microestrutura das brânquias bem como atividade de sistemas antioxidantes (catalase (CAT), concentração de glutathiona (GSH), atividade das glutathiona S-transferase (GST) e quantificação de pró-danos oxidativos peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO). Além disso, determinou-se a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo, quantificou-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile, avaliou-se a genotoxicidade pelo ensaio cometa em sangue e brânquias e a mutagenicidade pelo teste do micronúcleo (MN) e de alterações morfológicas nucleares (AMN).

A utilização de uma metodologia integradora de resposta de biomarcadores foi aplicada, o “Integrador de Respostas de Biomarcadores” (IBRv2) (Sanchez et al., 2013). O IBR permitiu avaliar as respostas específicas de biomarcadores em cada local analisado (Beliaeff e Burgeot, 2002). Apesar de ainda serem pouco utilizados, esses índices podem ser instrumentos importantes para chegar a um bom diagnóstico ecológico (Wo et al., 2009, Vasseur e Cossu-Leguille, 2003).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área de estudo

LOCAL 1 (L1) (23°39'22.05"S/52°39'46.74"O): O ribeirão Bolivar (Figura 1. B) está inserido na bacia hidrográfica do rio dos Índios, porção média do rio, trecho avaliado apresenta boas características de conservação de sua mata ciliar. Ao longo de sua extensão, em seu entorno, há predomínio do cultivo de soja, atividades de pastoreio e intervenções antrópicas como pontes e tubulações. Sua água é captada para tratamento e abastecimento público do município de Cianorte – Estado do Paraná (23°39'44.79"S/52°36'46.80"O) (Figura. 1. A).

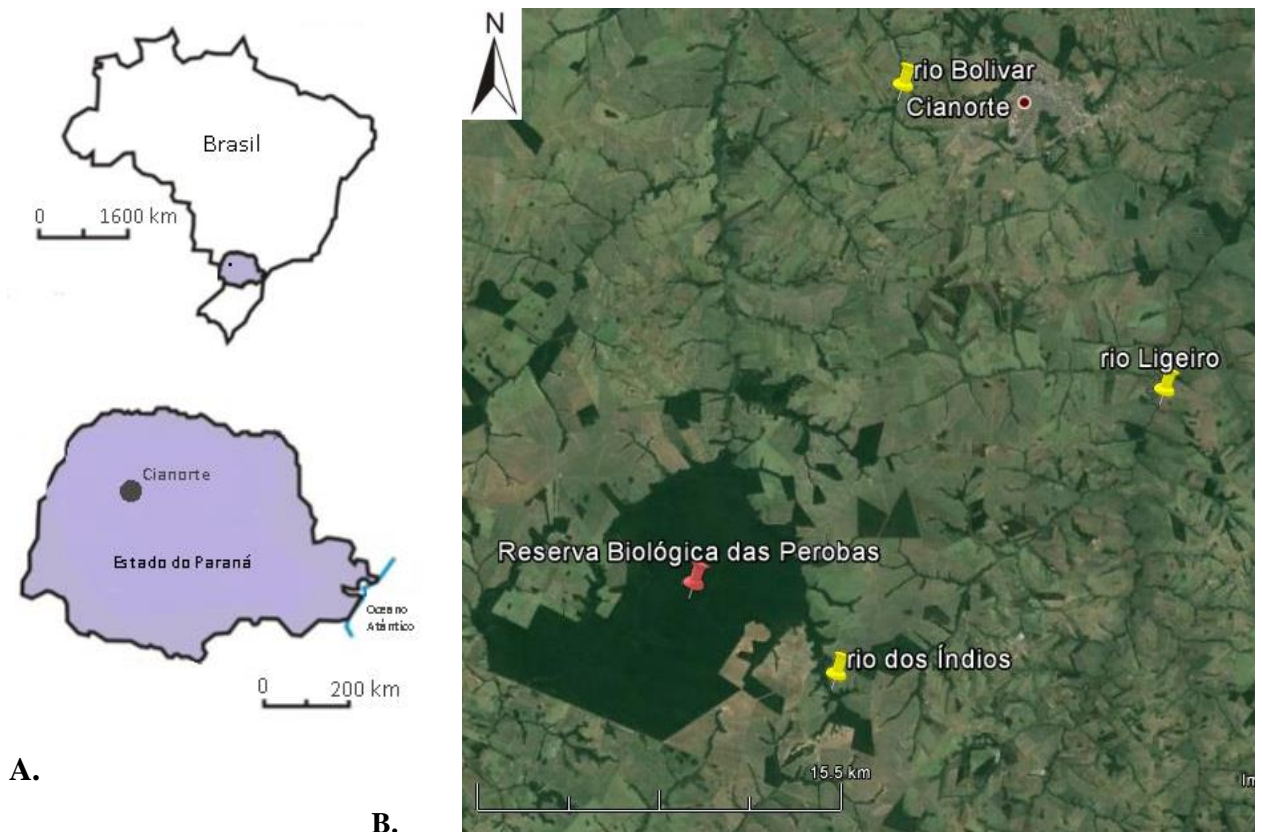


Figura 1. A. Localização geográfica do município de Cianorte, Leli et al. (2010) com modificações. B. Localização dos rios avaliados: Bolivar (L1), Ligeiro (L2) e dos Índios (REF) (Google Earth, 2015).

LOCAL 2 (L2) ($23^{\circ}47'00.64''S/52^{\circ}33'25.46''O$): O rio Ligeiro (Figura 1. B) possui nascentes que surgem próximas a centros urbanos e áreas rurais e o trecho avaliado apresenta boas características de conservação de suas matas. Ao longo de sua extensão, em seu entorno, há predomínio do cultivo de soja, atividades de pastoreio e intervenções antrópicas como pontes e tubulações. Sua qualidade está sob investigação para captação futura destinada ao abastecimento público do município de Cianorte.

REFERENCIAL (REF): Devido ao menor nível de interferência humana foi escolhido como referência um trecho do rio dos Índios ($23^{\circ}52'31.44''S/52^{\circ}41'38.50''O$) localizado dentro de uma Unidade de Conservação (Reserva Biológica das Perobas – Figura 1. B), que tem parte de suas nascentes protegidas por florestas de Mata Atlântica. Constitui a maior área de floresta remanescente das regiões norte e noroeste do Estado do Paraná.

5.2.2 Parâmetros físicos e químicos da água

As coletas de amostras de água (em tréplicas) foram realizadas nos meses de setembro de 2012, em 3 estações de amostragens correspondente a cada local avaliado. A temperatura, oxigênio dissolvido (YSI 550A), condutividade elétrica e pH (Digimed) foram verificados com auxílio de potenciômetros portáteis. As determinações de demanda bioquímica de oxigênio (DBO5) e demanda química de oxigênio (DQO) foram realizadas pela metodologia Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA-AWWA, 1998), em laboratório, até 24 horas após a coleta.

As frações de fósforo total e de fósforo reativo solúvel (orto-fosfato) foram quantificadas em espectrofotômetro, de acordo com Mackereth et al. (1978). O N-amoniaco e N-nitrato foram determinados segundo Mackereth et al. (1978). O nitrogênio total foi determinado pelo método de digestão com persulfato de potássio e hidróxido de sódio (APHA, 1992), que consiste na oxidação de todos os compostos de nitrogênio a N-nitrato.

Os resultados obtidos foram comparados com os limites estabelecidos pela legislação vigente (resolução Conama 357/2005) (Brasil, 2005).

5.2.3 Amostragem de peixes e material biológico

Foram capturados 94 exemplares de *Astyanax* spp. em amostragens realizadas em setembro de 2012, sendo utilizadas tarrafas, redes de arrasto e varas com linha e anzol em cada trecho amostrado, além de redes de espera de malhagens de 12 a 15 mm.

Optou-se pelo tratamento de gênero ao invés de espécie após constatar que nestes ambientes ocorria predomínio de duas espécies de *Astyanax*: *A. fasciatus* e *A. bimaculatus* e que em nível de espécie haveria o risco de não se obter indivíduos em número suficientes para realizar a pesquisa, especificamente, na microbacia (Local 1). Alguns fatores limitam a quantidade de indivíduos presentes nestes ambientes. Os locais de coleta situam-se próximos as regiões de cabeceira, de forma que não ocorre a entrada de peixes de outros tributários. Também a proximidade com a área urbana facilita o acesso de pessoas da comunidade aos corpos de água e favorece a pesca amadora, para lazer ou subsistência.

Após a captura, os peixes foram acondicionados em caixas isotérmicas (contendo água do local de captura) providas de aeração constante e, imediatamente, foram transportados ao laboratório, onde foram anestesiados com benzocaína 10%, diluída em água. A morfometria foi obtida previamente à retirada dos tecidos para os bioensaios e posterior dissecação. Em seguida,

os peixes foram sacrificados por super dosagem do anestésico (AVMA, 2012), conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Conduta no uso de animais em experimentação (CEAE) da UEM (112/2011-CEUA/UEM) (APÊNDICE A).

5.2.4 Proporção sexual

A proporção sexual foi determinada mediante as frequências de machos e fêmeas utilizando-se o teste de qui-quadrado (X^2 ; $\alpha=0,05$) para a verificação de eventuais diferenças significativas nestas proporções (Vazzoler, 1981).

5.2.5 Morfométricos

O fator de condição (K), foi estimado pela fórmula $K = Pt/Cp^b$, onde PT representa a massa corporal total em gramas e CP o comprimento padrão em centímetros, e b é o coeficiente angular da relação massa-comprimento, a partir da regressão linear entre os valores logaritmizados CP e PT (Le Cren, 1951). O valor b é a constante de crescimento relativo e tende a assumir valores próximos a 3, expressando um crescimento isométrico, ou seja, com taxas iguais de incremento em diferentes partes do corpo (Weatherley e Gill, 1987). Esta relação cúbica nem sempre é obedecida e pode ser abaixo de 3 (alométrico negativo) ou acima de 3 (alométrico positivo) (Pauly, 1993).

Fígado e gônadas foram coletados e pesados para o cálculo dos Índices Hepatosomático (IHS) e Gonadosomático (IGS). O IHS foi calculado pela fórmula $IHS = PF/PT \times 100$, onde PF representa a massa do fígado em gramas. O IGS foi estimado pela fórmula $IGS = PG/PT \times 100$, onde PG representa massa da gônada em gramas.

5.2.6 Histologia e Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos de fígados dos espécimes foram removidos e preparados para histologia de acordo com o protocolo padrão para microscopia de luz do Laboratório de Toxicologia Celular/UFPR. A inclusão em *Paraplast Plus*® (Sigma) e emblocamento das amostras foi realizada de acordo com Akaishi et al. (2004) (APÊNDICE B). Após a trimagem os blocos foram mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e seccionados em cortes de $5\text{ }\mu\text{m}$ de espessura (Micrótomo Leica RM 2145), corados com hematoxilina de Harris e eosina/floxina e analisados em microscópio de luz (Leica DME).

O segundo arco branquial esquerdo foi fixado em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2-7,4) e mantido a 4° C até a análise de acordo com o protocolo padrão para microscopia de luz do Laboratório de Toxicologia Celular/UFPR (APÊNDICE B). As imagens foram capturadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6360LV), do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

As alterações hepáticas foram avaliadas semiquantitativamente de acordo com o protocolo de Bernet et al. (1999) adaptado. A ocorrência de melanomacrófagos foi avaliada de acordo com Rabitto et al. (2005).

5.2.7 Análise bioquímica

As proteínas totais nas amostras foram estimadas de acordo com o método Bradford (1976). Um volume de 10 µl de sobrenadante ou PBS (branco) e 250 µl de reagente de Bradford (Sigma) foram colocados em placas de 96 poços e a absorbância foi medida em 595 nm após 5 min de incubação. O teor de proteína foi calculado através da comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN).

Para a atividade da Catalase, após determinação da concentração de proteínas, o sobrenadante resultante da centrifugação foi normalizado para 1,0 mg/ml, diluído em tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M pH 7,2. As amostras da enzima foram pipetadas em cubetas de quartzo (10 µl). Em seguida, foram adicionados 990 µl de solução reação 20 mM (Tampão Tris 1 M / EDTA 5 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 30% e água ultrapura, em concentrações específicas e mantida em banho-maria a 25°C). Foram lidas três réplicas de cada amostra. O primeiro intervalo de 30 s, com $r^2 = 0,99$ e o coeficiente de extinção de H₂O₂ de 40 M⁻¹cm⁻¹, foram utilizados para calcular a atividade da enzima.

O método consiste em mensurar a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria (AEBI, 1974). O aumento linear da absorbância foi monitorado em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, UV/Visible - Pharmácia Biotec), a 240 nm, por 1 min a cada 15 s. A atividade enzimática foi expressa em µmol. H₂O₂ degradado min⁻¹.mg proteína⁻¹.

O principal tiol não protéico, a glutathiona reduzida (GSH), foi medida após precipitação protéica com ácido tricloroacético 10% e centrifugação a 1000g por 15 min e 4°C. Um volume de 50 µl do sobrenadante e 230 µl de Tris-base (0,4 M, pH 8,9) foram colocados em uma placa de 96 poços, seguido pela adição de 20 µl de 5,5 '-ditio (2 - nitrobenzóico ácido) (DTNB) 2,5

mM, em 25% de metanol. As absorvâncias foram determinadas a 415 nm e a concentração de GSH foi calculada por comparação com uma curva padrão de GSH (Sedlak e Lindsay 1968, Griffith,1980).

Para a atividade da Glutathione S-transferase (GST) foi utilizado o método de Keen et al. (1976). As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorvância, através da leitura em microplacas.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído na proporção 1:10 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1 M pH6,5, e 20 µl deste foi pipetado nas microplacas. Em seguida, foram adicionados 180 µl de solução reação (CDNB 2,5 mM, GSH 2 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5), para realização imediata da leitura (quatro réplicas de cada amostra). O aumento de absorvância foi imediatamente medida a 340 nm (Keen et al., 1976) por 2 min em intervalos de 12 s e o primeiro intervalo de 1 min com $r^2 = 0,99$ e o coeficiente de extinção molar do CDNB de 9,6 mM de 1.cm⁻¹ foram utilizados para calcular a atividade da enzima, em espectrofotômetro de microplaca Sunrise – TECAN.

A análise da Lipoperoxidação lipídica baseia-se no método descrito por Jiang et al. (1991; 1992) e Hermes-Lima et al. (1995). A determinação da lipoperoxidação foi feita segundo o ensaio Laranja de Xilenol ou Ensaio FOX modificado, que tem por princípio a rápida oxidação do Fe⁺² mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe⁺³ laranja de xilenol (fonte de absorção de luz), na presença do estabilizador hidroxitolueno butilato (BHT).

O conteúdo carbonilas (proteínas carboniladas) foi determinado espectrofotometricamente a 360 nm, utilizando o coeficiente de absorção molar de 2,1 x 10⁴M⁻¹cm⁻¹ para hidrazonas (Levine et al., 1990, Quinlan e Gutteridge, 2000). Para esta análise, foi adicionado 800 µl de meio de reação a 200 µl do sobrenadante ainda congelado de fígado. Os tubos foram fechados e mantidos a temperatura ambiente durante 20 min e agitados por inversão a cada 3 min. Foram centrifugados a 9.000 g por 10 min a 4°C. Em seguida, 200 µl do sobrenadante dessa última centrifugação foi pipetado em microplacas, com 800 µl de solução reação (metanol 90%, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 25 mM, BHT 4 mM, sulfato ferroso amoniacal 250 µM, e laranja de xilenol 1 mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas, a 570 nm. O resultado foi expresso em equivalentes de CHP (concentração de hidroperóxido) pela quantidade de proteína encontrada na amostra (nmol.mg proteína⁻¹).

Após a determinação da concentração de proteínas, as amostras foram normalizadas (diluídas em PBS) para 2,0 mg.ml⁻¹. Foram separados 200 µl do sobrenadante de cada amostra

em 2 tubos (uma para o teste e outra para o branco). Aos tubos brancos foram adicionados um volume de 500 µl de HCl (2 M, sem DNPH) e tubos com as amostras 500 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (10 mM DNPH em 2 M de HCl), sendo o conteúdo misturado em vortex por 5 min e mantidas a 30°C por 90 min. As proteínas foram precipitadas pela adição de 700 µl de ácido tricloroacético a 28 % e centrifugadas a 9.000 g, 4°C por 10 min. Os pellets de proteínas foram lavados três vezes pela suspensão em etanol/etil acetado (1:1), misturados em vortex e centrifugados novamente. As proteínas foram então solubilizadas em 500 µl de solução de hidrocloreto de guanidina, misturados em vortex e centrifugadas em 9.000 g por 3 min para remover traços de material insolúvel. A presença de carbonilas foi medida espectrofotometricamente a 360 nm e a concentração de carbonilas determinadas usando o coeficiente de absorção molar de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para hidrazonas e normalizada pelo conteúdo total de proteínas, quantificadas em uma alíquota reservada da primeira centrifugação (Jiang et al., 1992).

Para medir a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) foram homogeneizados 0,2 a 0,3 g do músculo em 0,5 ml em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5. Foi completado para 1,5 ml, centrifugado a 12000 g durante 20 min a 4°C. Separou-se alíquotas do sobrenadante de 50 µl (para determinação da concentração de proteínas) e 200 µl (atividade da acetilcolinesterase) em tubos de 2 ml, as quais foram congeladas em tubos tipo eppendorfs a -20°C e armazenadas em freezer -80°C. Foi pipetada em microplaca 50 µl da fonte de enzima com 200 µl de DTNB (0,75 mM) e 50 µl de iodeto de acetiltiocolina (9 mM). Foram lidas três réplicas de cada amostra. A atividade da AChE foi medida segundo o método Ellman et al. (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O substrato, iodeto de acetiltiocolina, é hidrolizado pela enzima, liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) para produzir o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato. A absorbância foi medida a 405 nm, em espectrofotômetro de microplaca, Sunrise - TECAN. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

5.2.8 Ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade

Para verificar a frequência de micronúcleo písceo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN) em sangue periférico, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975). A leitura foi feita por teste cego contando-se 2.000 células por animal. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos dos eritrócitos que não se enquadraram no

conceito de micronúcleo, mas que poderiam ser descritas como alterações morfológicas nucleares, segundo Ayllon e Garcia-Vasquez (2000), também foram analisadas.

O Ensaio Cometa em células de sangue periférico e de brânquias foi feito de acordo com Speit e Hartmann (1999), com modificações de Ferraro et al. (2004) e Rammsdorf et al. (2009). Para cada espécime, 100 células (nucleóides) foram analisadas visualmente (Kobayashi et al., 1995), baseadas na migração dos fragmentos de DNA do núcleo. Foram confeccionadas 2 lâminas por animal, e contabilizadas cinquenta células por lâmina (totalizando cem células por animal) para obtenção da porcentagem de células danificadas por animal, a frequência de danos (FD). Cada célula danificada foi classificada de 0 a 4, de acordo com o tamanho da cauda e do nucleóide do cometa para se calcular o índice de dano (ID). Este índice foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível, pelo valor deste nível. Assim este índice variou entre 0 (todas as células sem danos – 0×100) a 400 (todas as células com dano máximo – 4×100) (Collins et al., 1999).

A viabilidade celular foi estimada por meio do teste de exclusão do corante azul de tripan. Amostras de sangue e homogeneizado de brânquias (40 μ l) e o corante azul de tripan a 0,4% (10 μ l) (não permeável em membranas íntegras) foram adicionados a um tubo de 0,5 ml e misturados. Após 1 min, 200 células foram classificadas visualmente em células viáveis e não viáveis sob microscopia de campo claro. Após a verificação de viabilidade celular acima de 75% prosseguiu-se com o ensaio cometa.

5.2.9 Resposta de biomarcador integrado

Os resultados dos biomarcadores foram aplicadas no índice "resposta de biomarcador integrado" (IBR) (Beliaeff e Burgeot, 2002) com modificações de Sanchez et al. (2013). Para o cálculo IBRv2, a razão entre os locais avaliados e o referencial para cada biomarcador foi log-transformado (Y_i) e, em seguida, a média global (μ) e o desvio padrão (s) foi calculada. Em seguida, os valores de Y_i foram padronizados pela fórmula: $Z_i = (Y_i - \mu)/s$, e a diferença entre Z_i e Z_0 (referencial) determinou os valores. O valor de IBRv2 final foi calculado para cada local comparativamente ao ponto referencial. Os dados foram representados na figura radar e indicam o desvio do biomarcador investigado em relação ao local de referência (0). A área superior a 0 reflete a indução do biomarcador, e abaixo de 0 indica redução do biomarcador (Vieira et al., 2014).

5.2.10 Procedimentos Estatísticos

As variáveis bióticas e abióticas foram expressas como média±desvio padrão e valores [min-max] plotadas graficamente. Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para identificação de possíveis diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as variáveis para os índices somáticos e biomarcadores morfológicos. O teste Tukey foi aplicado na comparação das concentrações encontradas entre os tecidos. Nos casos onde os pressupostos de normalidade e homocedasticidade não foram atingidos, as análises paramétricas foram substituídas pelos equivalentes não paramétricos.

5.3 RESULTADOS

A concentração de OD em todos os ambientes foram inferiores ao limite mínimo de 5 mg/LO₂ para classe 2 de águas doces, estabelecido pela Resolução CONAMA 357/2005. Constatou-se também, menor valor de OD no Referencial em relação ao L1 e L2. Os rios estudados apresentaram águas que tendem a acidez e com valores menores do que o limite estabelecido pela Resolução, que define para um rio classe II um pH variando de 6 a 9. Os demais parâmetros em todos os ambientes, encontram-se de acordo com os limites definidos pela resolução (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos de amostras de água coletadas nos pontos Referencial (REF), Local 1 (L1) e 2 (L2).

Parâmetros	REF	L1	L2
pH	5,25±0,03	5,24±0,02	5,36±0,07
T°C	21,90±0,10	22,30±0,10	22,36±0,05
CE (µS.cm-1)	52,70±0,84 ^a	37,66±1,62 ^b	37,06±0,83 ^b
OD (mg/L)	1,91±0,09 ^a	2,42±0,04 ^b	2,33±0,05 ^c
DBO (mg/L)	2,28±0,60	2,26±0,64	2,00±0,10
DQO (mg/L)	4,00±0,00	3,66±0,57	4,00±0,00
P- Total (ug/L)	13,58±3,67 ^{ab}	7,83±0,52 ^b	12,29±2,26 ^a
PO ₄ (ug/L)	1,73±0,32 ^a	4,44±1,86 ^a	1,73±0,44 ^a
N-Total (ug/L)	2973,08±303,36 ^a	3071,68±323,02 ^a	1203,86±50,37 ^b
NO ₃ (ug/L)	2100,08±87,73 ^a	2540,65±20,13 ^b	643,37±16,28 ^c
NH ₄ ⁺ (ug/L)	36,36±2,81 ^a	34,18±10,72 ^{ab}	26,59±4,83 ^b

Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. REF: Referencial. L1: Local 1. L2: Local 2; pH: potencial hidrogeniônico. T°C: Temperatura. CE: Condutividade elétrica. OD: Oxigênio Dissolvido. DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio. DQO: Demanda Química de Oxigênio. P- Total: Fósforo total. PO₄: Ortofosfato. N-Total: Nitrogênio total. NO₃: Nitrato. NH₄⁺: Íon amônio.

A proporção de fêmeas e machos não diferiu significativamente de 1:1 em nenhum dos locais (Tabela 2). Não houve diferenças significativas nos valores de χ^2 (<3,84) entre os locais, porém nota-se um pequeno predomínio de machos (52,94%) em relação as fêmeas (47,06%) no L2. Já em L1 e REF o predomínio foi de fêmeas.

Tabela 2. Número de indivíduos de cada sexo, proporção sexual (%) e teste de homogeneidade (teste do Qui-quadrado – χ^2) por ambiente amostrado.

Local	Cp (cm)	Pt (g)	FÊMEAS		MACHOS		TOTAL	χ^2
			Nº	%	Nº	%		
REF	7,43±0,85	11,08±3,49	35	59,32	24	40,68	59	3,48
L1	7,05±0,83	9,42± 2,99	10	55,56	8	44,44	18	1,23
L2	8,52±0,44	15,01 ±2,12	8	47,06	9	52,94	17	0,35
TOTAL			53	56,38	41	43,62	94	1,63

Legenda: REF: Referencial. L1: Local 1. L2: Local 2. Cp: Comprimento padrão. Pt: Peso total. ($\alpha=0,05$).

Os valores médios para o fator de condição (K), índice hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS) não apresentaram variação significativa (Figura 1). Crescimento alométrico negativo ($b < 3$) foi observado na análise do coeficiente angular de alometria dos indivíduos totais.

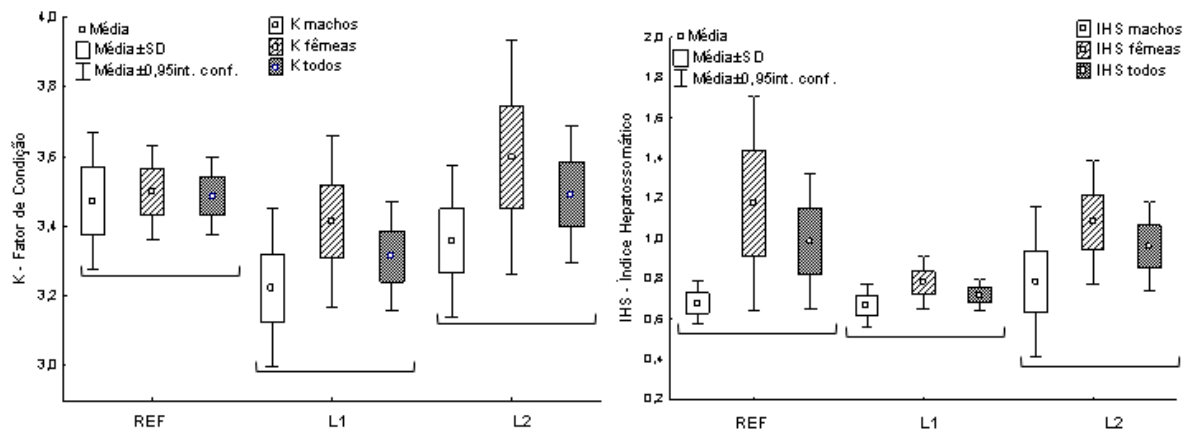


Figura 1. Fator de condição e Índice hepatossomático de machos, fêmeas e indivíduos totais de *Astyanax* spp. ($\alpha=0,05$).

A ocorrência de pelo menos um tipo de lesão hepática foi constatado em 85% dos indivíduos do REF, em 82,3% dos indivíduos de L1 e em 94,4% dos indivíduos de L2 (Tabela 3). Congestão vascular (Figura 2. D) e infiltração leucocitária (Figura 2. C), com um percentual de mais de 50% verificados em indivíduos dos três locais, maior percentual de necrose (Figura

2. B) e de melanomacrófagos no L1, de parasitas (Figura 2. H) no REF e de colestase (Figura 2. G) no L2.

Tabela 3. Prevalência (%) de alterações histopatológicas detectadas no fígado de *Astyanax* spp. Note-se que os peixes individuais podem ter mais de um tipo de lesão presente.

Padrão de reação	Fator de importância	REF (N=20)	L1 (N=17)	L2 (N=18)
Distúrbios circulatórios:				
Congestão vascular	I	50 (10)	58 (10)	61 (11)
Melanomacrófago livre	II	0	17 (3)	5 (1)
Centro de Melanomacrófago	II	0	0	0
Depósitos:				
Colestase	II	10(2)	29 (5)	33 (6)
Esteatose	I	20 (4)	0	22 (4)
Reação inflamatória:				
Infiltração leucocitária	II	50 (10)	52 (9)	66 (12)
Parasitas	II	35 (7)	11 (2)	11 (2)
Alteração nuclear	II	0	5 (1)	0
Necrose	III	45 (9)	52 (9)	30(6)
Neoplasia	III	0	0	0

Número entre parênteses equivale ao número de indivíduos que apresentaram alterações. N = número de indivíduos analisados. Fator de Importância (Bernet, 1999).

Maior percentual de hiperplasia de lamelas secundárias foi verificado nas brânquias dos peixes de REF e L2 (50%) (Tabela 4). Em 33,3 % dos locais 1 e 2 constatou-se aneurisma e presença de parasitas (Figura 3. D e E). Em menor incidência foram verificados parasitas, hipertrofia, fusão lamelar e aneurisma nos indivíduos do REF (Figura 3. B). Observou-se em peixes de todos os locais avaliados fragilidade do tecido devido ao desprendimento de células epiteliais (Figura 3. F).

Tabela 4. Percentual (%) de alterações histopatológicas em brânquias de *Astyanax* spp.

Local	Hiperplasia	Hipertrofia	Fusão Lamelar	Parasitas	Aneurisma
REF	50 (3)	16,6 (1)	16,6 (1)	16,6 (1)	16,6 (1)
L1	33,3 (2)	0	16,6 (1)	33,3 (2)	16,6 (1)
L2	50 (3)	33,3 (2)	16,6 (1)	33,3 (2)	33,3 (2)

Número entre parênteses equivale ao número de indivíduos que apresentaram alterações.

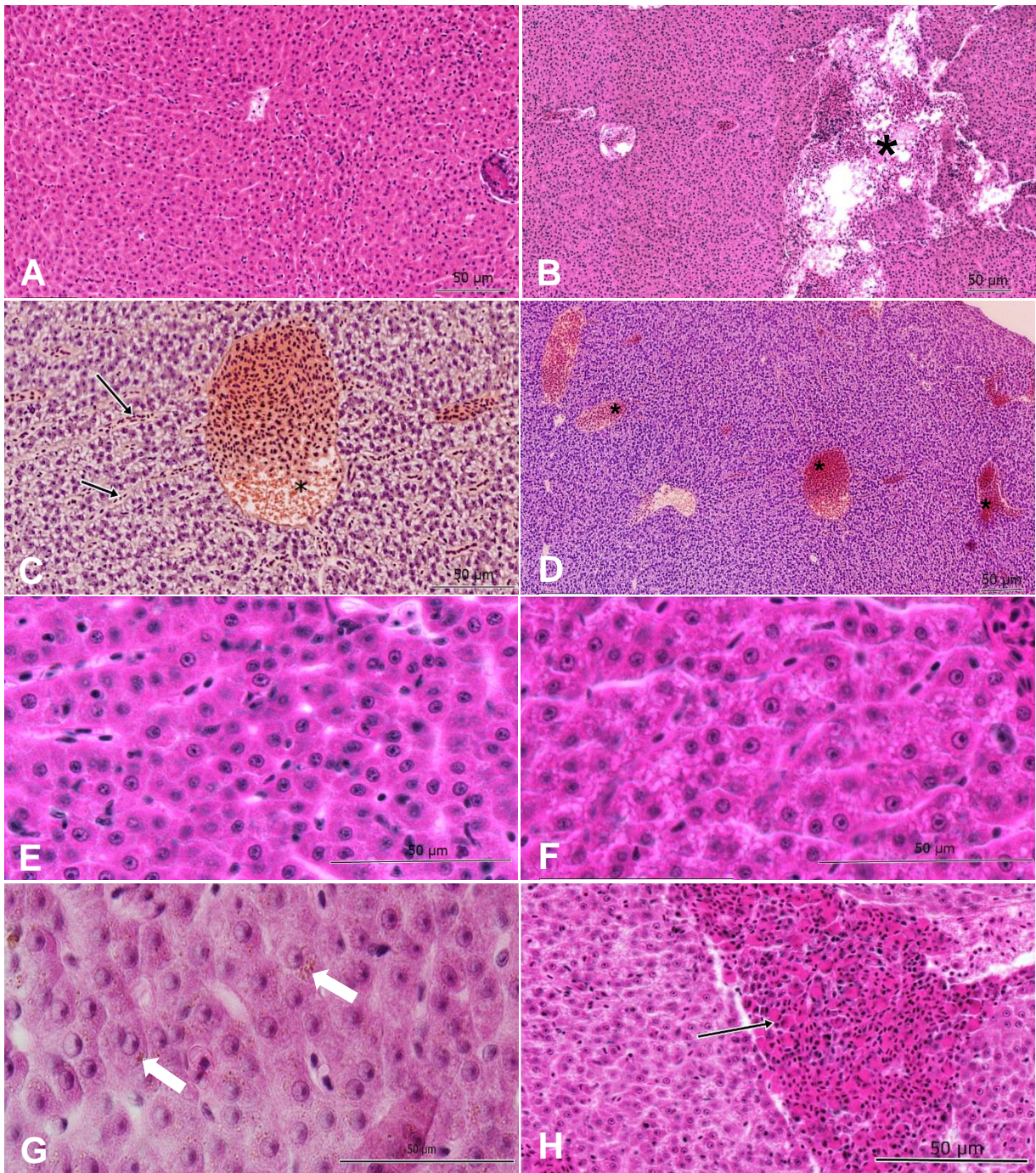


Figura 2. Histologia de fígado em indivíduos (*Astyanax* spp.) **A.** Aspecto normal de tecido hepático inalterado (L1); **B.** Área necrosada (*) (L1); **C.** Congestão vascular (*) e infiltração leucocitária (seta) (L2); **E.** Aspecto tecido inalterado (REF). **F.** Esteatose (REF). **G.** Colestase (L2); **H.** Presença de parasitas (seta) (REF).

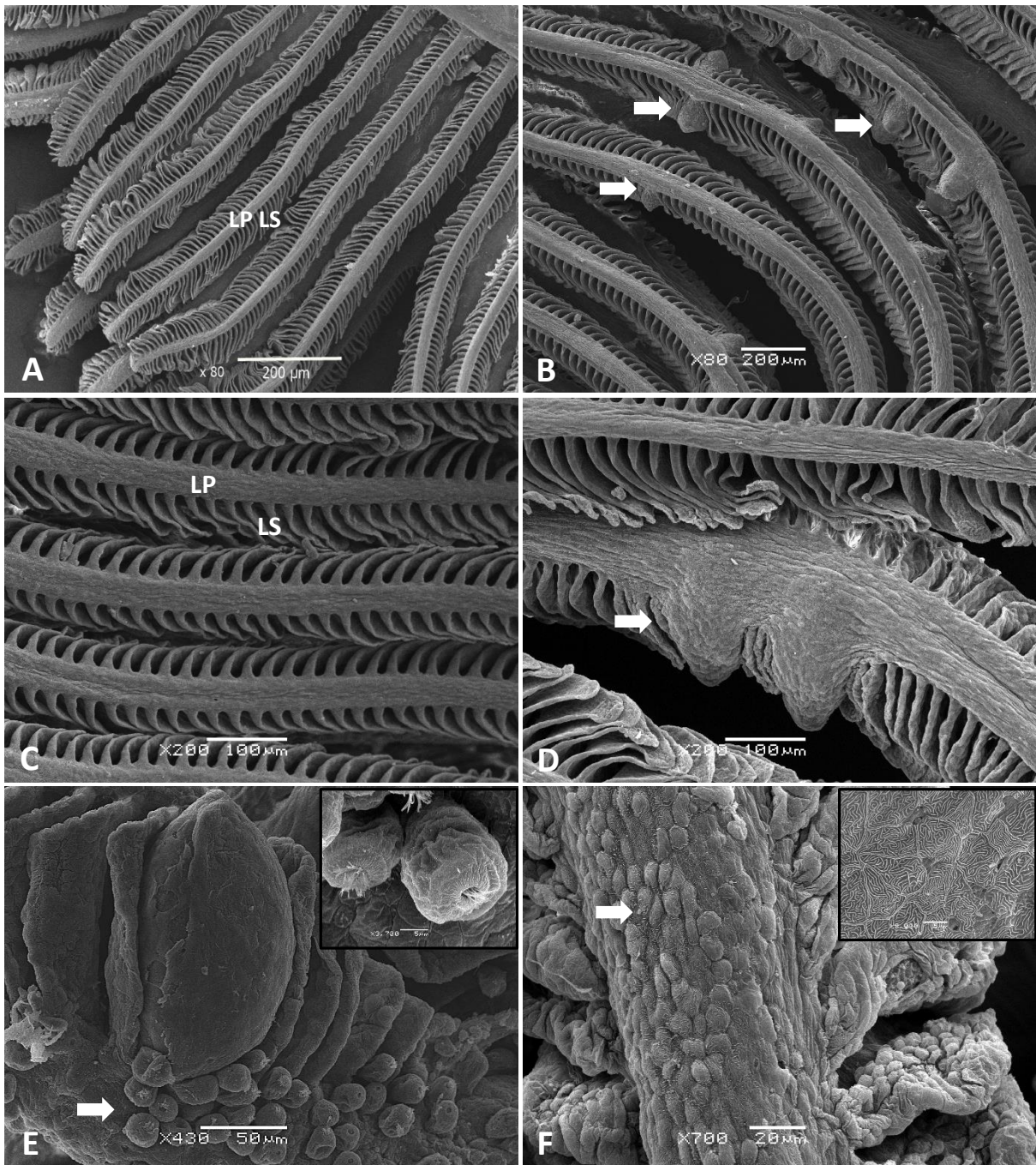


Figura 3. Alterações em brânquias de *Astyanax* spp. **A e C.** Vista geral e aspecto normal da brânquia, lamelas primárias (LP) e lamelas secundárias (LS) (REF). **B.** Aneurismas em LS (REF). **D.** Hiperplasia em LS e LP e fusão lamelar (L1). **E.** Aneurisma em LS e infestação por parasitas, no detalhe ampliado parasita fixado em LP (L2). **F.** Fragilidade do epitélio em LS e hipertrofia com perda das microdigações em LP (L2), no detalhe ampliado aspecto normal mostrando microdigações na superfície das células epiteliais em LP (REF).

Na comparação entre os locais, os indivíduos do REF apresentaram menor valor significativo para a atividade das CAT e GST no fígado (Figura 4). Um aumento da atividade dessas enzimas foi observado nos peixes do L1 seguido pelo L2. Diferença significativa ($p=0,011248$) entre ambos foi verificado na atividade da CAT. A concentração de glutatona reduzida quantificada (Figura 4) foi superior nos peixes do REF ($p=0,001318$) e L1 ($p=0,007447$), os quais também apresentaram concentrações estatisticamente semelhantes. A menor concentração foi verificada nos indivíduos do L2.

Os peixes do REF apresentaram uma elevação na atividade da AChE (Figura 4) com diferença significativa ($p=0,025598$) comparado ao L1 e não diferiu do L2. Entre os locais 1 e 2 também não houve diferença.

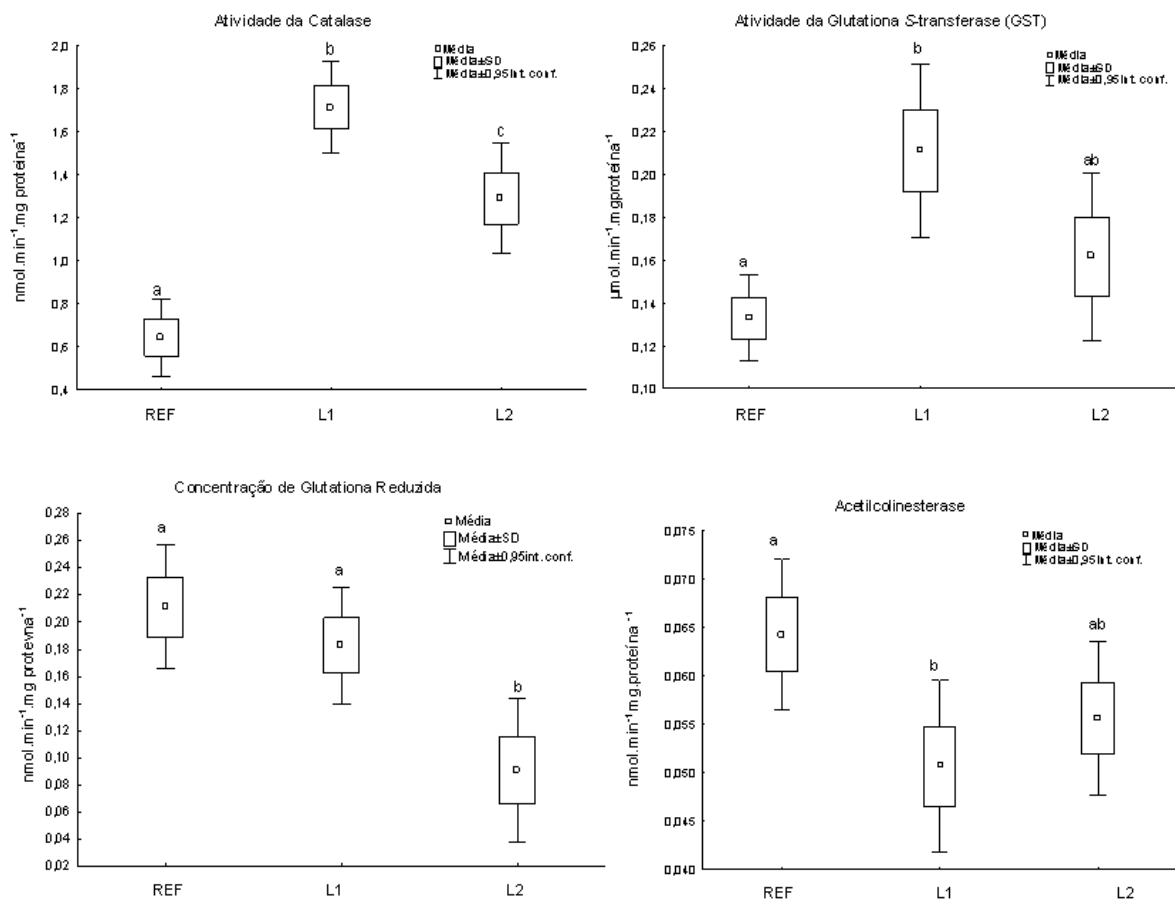


Figura 4. Atividade da Catalase hepática, Glutaciona s-transferase hepática e Acetilcolinesterase muscular e Concentração de Glutaciona reduzida hepática de *Astyanax* spp. As barras expressam a média da atividade \pm desvio padrão. Análise estatística dos dados, em classes de médias indicadas por letras (a, b, c, d, ab, bc). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Diferenças significativas foram verificadas entre os locais para a quantidade de hidroperóxidos lipídicos (Figura 5). A peroxidação lipídica estava elevada nos indivíduos de L2 ($p>0,01$), seguido pelo L1 ($p>0,05$), se comparados aos peixes do REF. Para o acúmulo de proteínas carboniladas (Figura 5) notou-se o contrário, com valores mais elevados nos indivíduos do L1 e REF e menor acúmulo nos peixes de L2.

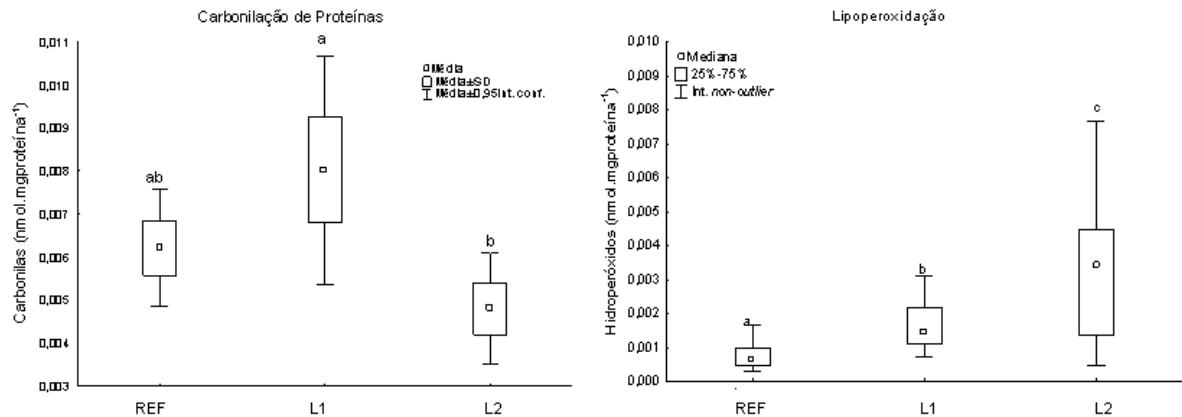


Figura 5. Concentração de hidroperóxidos (LPO) e carbonilas (PCO) no fígado de *Astyanax* spp. PCO: As barras expressam a média concentração \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. LPO: $\alpha=0,05$.

Não foram verificadas diferenças significativas na concentração média dos metabólitos de 2, 4, 5 e 6 anéis de HPAs (Figura 6) entre os locais avaliados.

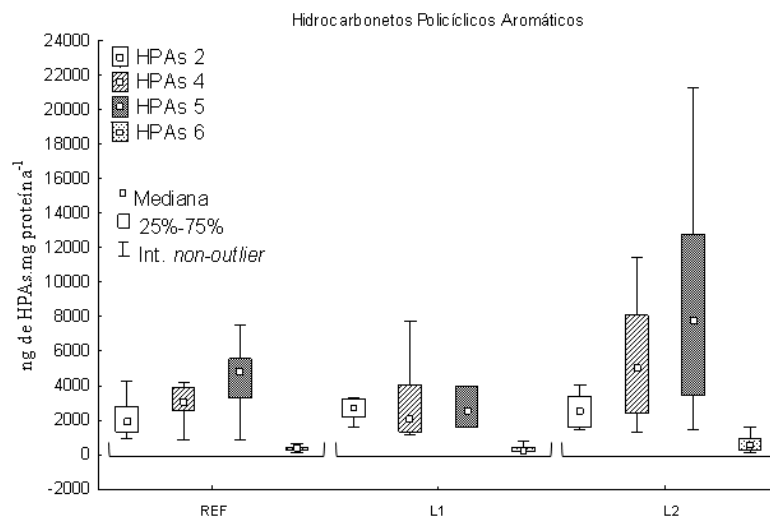


Figura 6. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de 2 a 6 anéis por mg de proteína de bile de *Astyanax* spp. ($\alpha=0,05$).

Diferença significativa foi observada na frequência de danos pelo ensaio cometa (Figura 7) em eritrócitos, sendo que os animais do L2 apresentaram menor FD em relação ao REF, e nas brânquias observou-se o contrário, o que representa maior quantidade de danos em níveis intermediários neste órgão em peixes de L2. O índice de danos não diferiu entre os locais, tanto para os eritrócitos quanto para as brânquias.

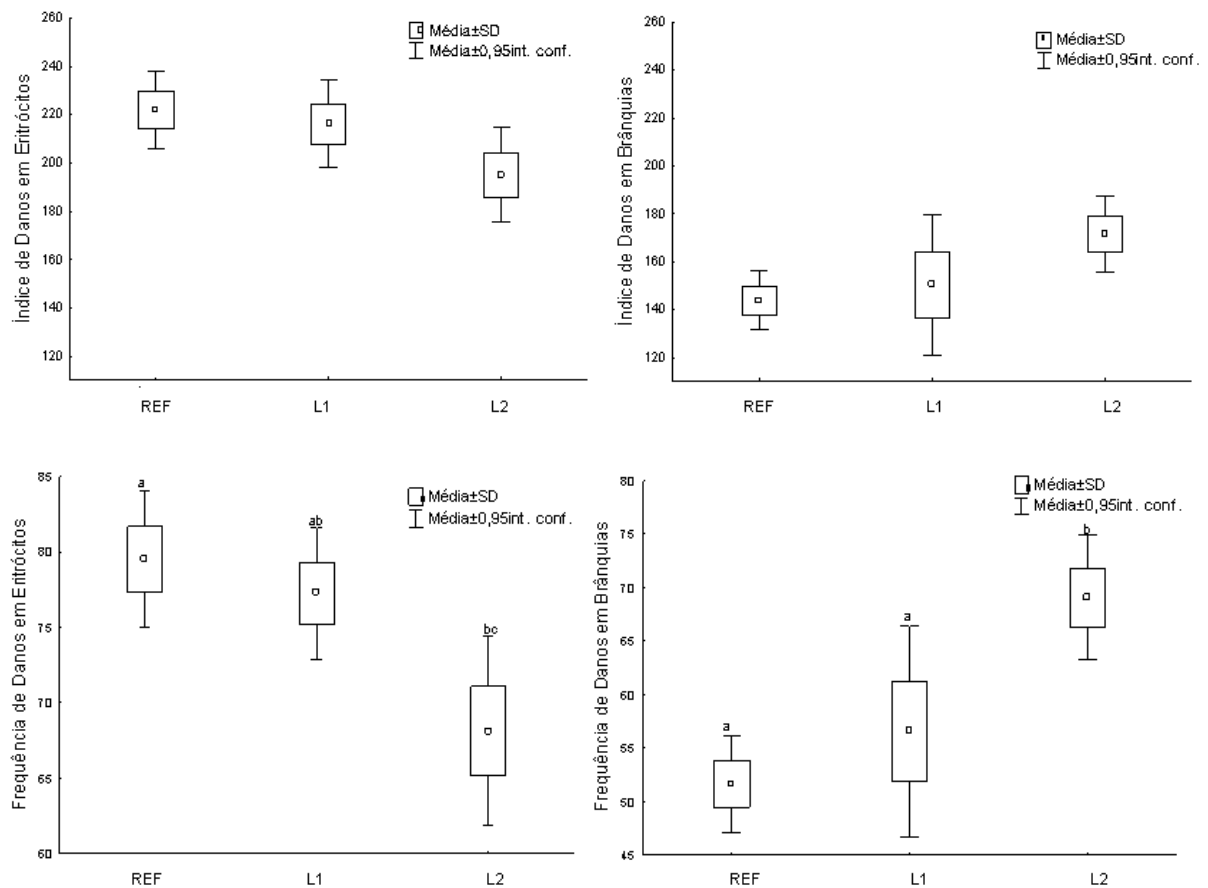


Figura 7. Índice e frequência de danos do DNA de eritrócitos e brânquias de *Astyanax* spp. As barras expressam a média das alterações \pm desvio padrão. Análise estatística dos dados, em classes de médias indicadas por letras (a, b). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos para as frequências médias de MN e ANs totais (Tabela 5). Avaliadas separadamente, as ANs do tipo BN e LB diferiram significativamente entre REF e L2, com menor frequência observada em L2 para BN e nos locais 1 e 2 para LB. Apesar de não haver diferença significativa, o L2 apresentou menor quantidade de MN e de ANs totais em relação aos demais locais.

Tabela 5. Frequência (%) de micronúcleos, anormalidades nucleares totais, núcleos binucleados e “*Lobed*” em eritrócitos de *Astyanax* spp.

Localidade	MN	AN*	BN	LB
REF (n=20)	1,03±0,74	2,85±2,16	0,47±0,78 ^a	0,38±0,49 ^a
L1 (n=17)	1,15±1,00	2,88±2,37	0,24±0,40 ^a	0,06±0,17 ^b
L2 (n=18)	0,67±0,77	1,94±1,28	0,03±0,12 ^b	0,08±0,19 ^b

*Anormalidades nucleares totais (AN)= Eritrócito Binucleado (BN); Broto Nuclear (BRN); Núcleo “blebbed” (BL); Núcleo “lobed” (LB); Núcleo “notched” (NT); Núcleo “vacuolated” (V). $p < 0,05$

O L1 é o ambiente com menor valor registrado do IBRv2 (6,59) sendo, portanto, o local do qual os peixes apresentaram valores dos parâmetros biológicos avaliados pelo índice, mais próximos do ponto referencial. O maior valor de IBRv2 foi verificado em L2 (15,02), no entanto, ainda inferior quando comparado à um local impactado (26,06). Constatou-se, por meio dos vetores da figura, que as maiores contribuições para o IBRv2 no L1 foram das concentrações de HPAs/2 e atividade da CAT, enquanto que no L2 HPAs/2,4,5,6, EC-IDB, EC-FDB, CAT e LPO.

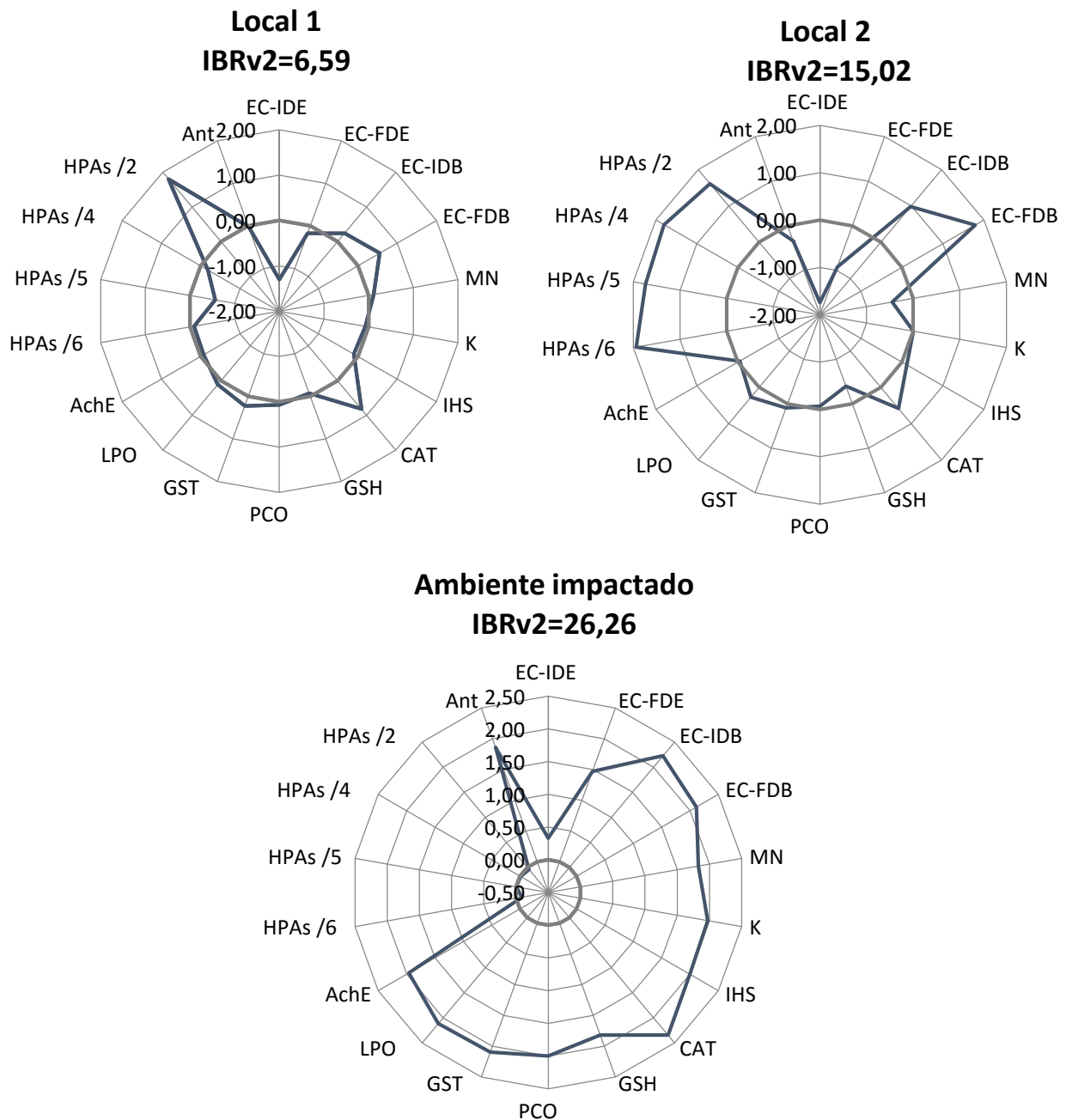


Figura 8. Resposta integrada dos biomarcadores (IBR) dos rios Bolivar e Ligeiro e de um local impactado em relação ao ponto referencial (Índios). Fator de condição (K), catalase (CAT), glutathiona reduzida (GSH), índice de dano em DNA de Eritrócitos (EC-E), índice de dano em DNA de Brânquias (EC-B), lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteínas (PCO), acetilcolinesterase (AChE), alterações morfológicas nucleares totais (ANt), índice gonadotrófico (IGS), glutathiona S-transferase (GST), índice hepatossomático (IHS), micronúcleo (MN), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Local impactado rio Pinhalzinho, Umuarama-PR (Barros, 2013).

5.4 DISCUSSÃO

Os dados morfométricos de *Astyanax* spp. mostraram-se de acordo com o descrito para este grupo (Alberto et al., 2005; Shibatta e Hoffmann, 2005; Navarro et al., 2006; Almeida, 2007; Bertolucci et al., 2008).

A proporção sexual observada em todos os locais estava dentro do esperado (Nikolsky, 1969) o que indica que as condições dos ambientes se encontram adequadas para o desenvolvimento proporcional entre os sexos deste gênero. Apesar de não diferir significativamente, a pequena variação observada entre machos e fêmeas, em particular nos pontos REF e L2, pode estar relacionada ao período da coleta e ao estado trófico. A tendência é de que no inverno a proporção geralmente se mantenha mais próxima de 1:1 (Fontoura et al., 1993; Abilhoa, 2007; Silva et al., 2012), no entanto, neste período a produtividade do sistema pode diminuir. De fato, dos parâmetros limnológicos que determinam o estado trófico do rio a maior concentração de fósforo no REF e L2 pode significar que o estado nutricional destes ambientes estava mais elevado do que em L1.

O crescimento alométrico negativo, considerando os sexos agrupados observado em todos os locais, mostra que houve um incremento em peso menor do que em comprimento (Orsi et al., 2002). Este aumento desproporcional pode estar associado a fatores como densidade populacional, disponibilidade de alimento e características limnológicas. Os índices morfométricos, aparentemente, demonstraram que as condições prevalentes em todos os ambientes, no período da coleta, encontravam-se dentro do intervalo de tolerância para o gênero. Alterações nestes índices podem exigir períodos de exposição mais longos do que os considerados, uma vez que o estágio de vida dos organismos é desconhecido. Diferenças entre grupos de peixes de *habitats* contaminados e preservados são relatadas em estudos conduzidos por períodos maiores de tempo (Levesque et al., 2002).

As lesões moderadas e regressivas, observadas no fígado de todos os animais, foram as de maior prevalência em relação as mais severas e irreversíveis. As lesões hepáticas podem ser resultantes da exposição a compostos tóxicos ou efeito do estresse natural do ambiente. É provável que as respostas inflamatórias nos peixes do REF, estejam associadas a presença de parasitas e nos demais locais à necrose (Van der Oost et al., 2013), o que também poderia justificar a presença de MML nos peixes de L1 e L2, uma vez que sua função é a limpeza do tecido (Abdel-Moneim et al., 2012). Barros (2013) também reportou melanomacrófagos em *Astyanax* spp. de locais contaminados e referenciais, bem como elevada incidência de tecido necrosado, aos quais o autor atribui o estresse oxidativo e lesões associadas como principais

causas, devido as variações do ambiente natural e contaminação dos locais por diferentes fatores antrópicos.

Outras alterações como a congestão vascular e as inclusões podem ser decorrentes de processos metabólicos ligados a destoxificação. Alterações semelhantes foram encontradas em *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus* de um reservatório contaminado por metais e organoclorados (Paulino et al., 2014). Os autores também reportaram a presença de necrose, esteatose, melanomacrófagos e hipertrofia nos peixes do ponto referencial, o que demonstra que efeitos de estressores naturais podem se refletir em respostas similares as verificadas em casos de exposição a contaminantes. Dependendo da incidência as lesões podem ser reparadas com o tempo com a melhora da qualidade da água, mas progredem caso o nível de contaminação se mantenha ou aumente. Quando há um comprometimento total do tecido este não pode ser restaurado (Paulino et al., 2014).

As vacuolizações verificadas (esteatose e colestase) foram relatadas em estudos laboratoriais em peixes expostos a diferentes compostos tóxicos (Greenfield et al., 2008; Triebkorn et al., 2008; Abdel-Moneim et al., 2012). Acredita-se que o acúmulo de lipídios, que, apesar de ser um armazenamento fisiológico normal, pode tratar-se da fase pré-necrótica, mas também ocorre como um mecanismo de defesa contra contaminantes lipossolúveis na tentativa de imobilizá-los (Biagianti-Risbourg et al., 1998).

De um modo geral as lesões observadas são todas reparáveis, com exceção da necrose. Considerando todos os animais e todas as lesões, as mais graves e irreversíveis apresentaram uma incidência muito baixa. Por exemplo, não foram verificadas neoplasias que geralmente são resultantes de exposição a longo prazo em ambientes com concentrações elevadas de uma combinação de poluentes potencialmente cancerígenos (Dey et al., 1993). Além disso, não foram observadas correlações entre os índices somáticos (IHS e IGS) e as alterações morfológicas, que são esperados quando o nível de comprometimento do estado de saúde geral do peixe é maior (Schulz e Martins-Junior, 2001; Yang et al., 2004; Sol et al., 2008).

Um dado importante encontrado foi a maior prevalência de lesão no fígado em relação as brânquias dos animais de todos os pontos avaliados, confirmando os efeitos acumulativos de danos neste órgão. Resultados semelhantes foram verificados por Paulino et al. (2014) em *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus*. Nestes peixes, uma incidência maior de lesões hepáticas ocorreu em resposta a presença de metais e organoclorados no fígado e as alterações mais comuns encontradas por esses autores nas brânquias foram a hipertrofia e hiperplasia. Danos mais agressivos no fígado também foram reportados por Jin et al. (2010) em resposta à herbicidas. A bioacumulação de organoclorados e metais nas brânquias e no fígado é o resultado

de uma combinação de fatores físicos e químicos e também da capacidade das células do fígado e das brânquias em metabolizar (Sakuragui et al., 2013) e eliminar estes compostos.

As patologias mais frequentes verificadas nas brânquias foram a hiperplasia das lamelas secundárias e primárias e com menor frequência hipertrofia, fusão lamelar e aneurisma, bem como a presença de parasitas. Estas lesões muitas vezes decorrem de uma adaptação a presença de poluentes, na tentativa de conservar algumas funções fisiológicas. Elas podem ocorrer em resposta às condições adversas, resultantes de infecções bacterianas ou parasitárias ou contaminantes (Garcia-Santos et al., 2007; Fontáinha-Fernandes et al., 2008). A bifurcação da lamela primária, alteração incomum observada em um indivíduo do rio Bolivar, também foi registrada por Barros, (2013) e Pereira et al. (1992). Os autores atribuíram esta condição patológica à contaminação dos ambientes próximos a regiões urbanizadas e é normalmente detectado em animais jovens.

Lesões e alterações em brânquias são extensivamente reportadas em estudos de laboratório utilizando peixes expostos à concentrações subletais e letais de herbicidas (Rathod, 2011; Olufayo; Alade, 2012; Vigário et al., 2014), inseticidas (Vidhya e Radhakrishnan, 2013; Ezhilmathy et al., 2014; Georgieva et al., 2014), metais (Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Muthukumaravel e Rajaraman, 2013; Georgieva et al., 2015) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Spies et al., 1997).

Em campo, essas alterações foram observadas em animais de reservatórios contaminados por organoclorados e metais (Paulino et al., 2014), provenientes de córregos poluídos por esgoto doméstico (Winkaler et al., 2001), efluentes industriais (Teh et al., 1997) e de sistemas de água doce naturais com diferentes níveis de interferência antrópica e misturas de contaminantes (Meletti et al., 2003; Stentiford et al., 2003; Lupi et al., 2007; Triebkorn et al., 2008; Yasser; Naser, 2011; Cantanhêde et al., 2014). De modo geral os autores alertam para o fato de que as concentrações subletais podem provocar mudanças progressivas e a ampla distribuição e persistência de compostos tóxicos em diferentes compartimentos do ambiente é um fator crítico que pode exercer efeitos mais acentuados em organismos nativos.

Outras lesões não incluídas no fator de importância patológico como a fragilidade do tecido e o descolamento de células epiteliais, porém relevantes, pois constituem respostas a agentes tóxicos (Araújo, 2009), foram observadas em quase todos os animais de todos os locais avaliados. O descolamento do epitélio respiratório também resulta no aumento da distância de difusão, o que afeta as trocas gasosas (Nowak, 1992). Estas mesmas alterações foram relatadas associadas a hiperplasia em *Metynnis roosevelti*, expostos a diferentes concentrações de um composto organofosforado, (Machado e Fanta, 2003) e em outras espécies de peixes de

ambientes contaminados por metais pesados (Oliveira Ribeiro et al., 1994; Garcia-Santos et al., 2007), acidez (Kawall, 1993) e impactados (Barros et al., 2013).

A baixa prevalência de fusão lamelar, alteração considerada mais severa (Bernet, 1999) nos indivíduos de todos os ambientes avaliados, pode significar que estes animais foram expostos a condição de estresse natural ou à contaminantes com efeito menos acentuado, o que representaria descargas contínuas de poluentes, como por exemplo uma situação compatível com o escoamento agrícola. Com relação ao REF, as lesões encontradas podem estar mais relacionadas com o estresse do hábitat. Teh et al. (1997) encontraram lesões semelhantes em peixes de locais referenciais e lesões mais severas foram encontradas em peixes de locais contaminados. Os autores atribuem a isso o fato de que o ambiente de água doce contém múltiplos estressores que podem alterar de forma adaptativa a integridade estrutural de tecidos e órgãos críticos (Spies et al., 1996).

As características abióticas de ecossistemas naturais podem exercer forte interferência nos parâmetros biológicos e impõem até mesmo, um certo grau de dificuldade na interpretação dos dados de campo. Por exemplo, é sabido que a forma química de metais e outros contaminantes na água, temperatura, pH, concentração OD e transparência interferem na biodisponibilidade de diferentes contaminantes que podem afetar os peixes (Has-Schön et al., 2006). Estressores ambientais podem incluir, embora não estejam limitados, agentes patogênicos, parasitas, variação nos parâmetros físicos e químicos, regimes de assoreamento, competição entre as espécies, alteração na quantidade de alimentos e disponibilidade de *habitats* (Adams, 1990a; Adams, 1990b). A aplicação de um protocolo de avaliação rápida caracterizou os ambientes em boas condições de conservação, no entanto, a baixa concentração de OD (abaixo do limite mínimo estabelecido pela resolução do CONAMA 357/2005) foi verificado em todos os rios avaliados. Este é um fator limitante para os organismos aquáticos, e pode provocar respostas adaptativas (Sollid et al., 2003) a nível molecular e tecidual em peixes (Gracey et al., 2001; Negreiros et al., 2011).

A maioria dos poluentes e os seus metabólitos induzem a toxicidade por meio do EO resultante da produção excessiva ERO durante o metabolismo de biotransformação de xenobióticos nos tecidos (Lushchak, 2011). Metais de transição, quinonas, corantes, herbicidas bupiridílios e compostos aromáticos nitrados são conhecidos por serem potencialmente causadores de EO (Kappus e Sies, 1981). Em resultado, o aumento ou diminuição da atividade específica de algumas enzimas neutralizadoras (*scavengers*) de ERO, como a CAT e GST, tem sido relatado como indicador de EO. Estas respostas enzimáticas sugerem uma defesa do organismo na tentativa de eliminar ERO (Van der Oost et al., 2003).

A indução da atividade da CAT no L1 e L2 em relação ao REF, pode estar relacionada a excessiva formação de ERO. A atividade desta enzima pode ser inibida ou induzida dependendo da concentração, tempo e tipo de contaminante. A inibição por vezes está relacionada ao aumento da produção de ERO. Atividade aumentada da CAT no fígado vem sendo reportada em estudos dose-tempo-dependente, em alguns casos a redução apareceu nos menores tempos testados, e em outros permaneceu reduzida até finalizar o período de experimentação. Por exemplo, atividade aumentada foi reportada em peixes expostos a concentrações agudas não letais de pesticidas (Vasylykiv et al., 2011; Monteiro et al., 2015), herbicidas (Crestani et al., 2007; Ortiz-Ordoñez et al., 2011) e glifosato (Langiano e Martinez, 2008), durante 4 semanas a concentrações subletais de fenantreno (HPA) (Jee e Kang, 2005) e em peixes mantidos *in situ* em riachos em área agrícola (Vieira et al., 2014). Em campo a inibição da CAT foi reportada em locais com diferentes tipos de contaminantes por Bainy et al. (1996) e em *Astyanax* spp. por Barros (2013).

Pode ser que a especificidade esteja associada as condições diferentes entre o ambiente natural e experimental, como por exemplo as vias de exposição e os múltiplos estressores, que no caso do primeiro parece provocar maior variação na atividade desta enzima. Variáveis abióticas como temperatura e luminosidade também podem interferir na atividade desta enzima (Power e Sheehan, 1996), além disso pode estar correlacionada com os hábitos alimentares de peixes e tende a ser maior em onívoros do que nos herbívoros (Lackner, 1998).

Reforçando a ideia de que o EO seria a provável causa para o aumento da atividade da CAT é a maior concentração de PCO em L1, e de LPO em L2. Estes grupos também apresentaram percentuais elevados de áreas necróticas no tecido hepático. Os próximos resultados também apontam para esta suposição. A GST apresentou um comportamento semelhante ao da CAT, com maior atividade no L1 seguido pelo L2 em relação ao REF. Aumento da GST foi observado em laboratório de forma mais tardia do que o aumento da CAT após exposição a compostos tóxicos (Simonato et al., 2008; Nogueira et al., 2011). Este atraso, explica os autores, ocorreu provavelmente porque a indução desta enzima também está relacionada com a presença de metabólitos gerados pelo citocromo P450 durante a fase I do metabolismo xenobiótico. Dessa forma a CAT seria a enzima que responderia mais prontamente à toxicidade de ERO e a GST a metabólitos gerados pelas enzimas da fase I, o que confirmaria o EO, já que ambas as atividades de CAT e GST estavam aumentadas em L1 e L2. Se este for o caso, há uma possibilidade de os peixes terem sofrido exposição por um período coerente com as demais respostas fisiológicas discutidas na sequência.

Supondo-se que houve um aumento de ERO nos hepatócitos dos peixes dos locais com maior atividade da CAT, um meio de neutralizá-los seria através da reação com GSH. Os níveis mais elevados de GSH podem funcionar não apenas como uma defesa antioxidante não enzimática "extra", mas também eleva *in situ* a atividade das GSTs (transferases e peroxidases) e alguns peroxirredoxinas, pois o GSH é um substrato para estas enzimas (Poletta et al., 2015). A atividade elevada da CAT no L1 foi acompanhada do aumento na concentração de GSH e GST, enquanto que um decréscimo da GST foi observado no REF e da GSH no L2. A concentração de GSH pode variar de duas formas distintas em peixes expostos a estressores. O decréscimo, por vezes, corresponde a uma reação aguda, enquanto que o acréscimo representa uma adaptação ao aumento da atividade de detoxificação (Van der Oost et al., 2003) nesse caso decorrente de uma exposição crônica. Portanto o decréscimo da GSH bem como a elevada concentração da LPO nos animais do L2 pode ser um indicativo de um EO mais acentuado nos peixes deste local e a incapacidade de lidar com a elevada quantidade de ERO.

A redução do conteúdo celular de GSH tem efeito direto na capacidade das células em lidar com ERO e produtos nocivos de LPO e, subsequentemente, manterem-se viáveis (Lange, 2007). Por outro lado, os sistemas antioxidantes podem não ser ativados de forma significativa quando a formação de ERO ocorre em taxas muito reduzidas, neste caso mecanismos antioxidantes adicionais e independentes de GSH, no caso dos peixes do REF, podem ter sido suficientes para manter a homeostase celular (Lange, 2007).

A estimativa da concentração da LPO tem grande importância preditiva (Pandey et al., 2003), uma vez que representa o início da dissolução da membrana deixando as células expostas aos xenobióticos. É, portanto, um dos melhores marcadores de alerta precoce para avaliação de risco ambiental (Van der Oost et al., 2003). Os níveis de LPO aumentados têm sido observadas em peixes sob exposição a vários xenobióticos e em condições de estresse natural (López-Lopez et al., 2006; Tejeda-Vera et al., 2007; Farombi et al., 2008; Aras et al., 2009; Ballesteros et al., 2009). Em algumas espécies de *Astyanax* o aumento da LPO foi relacionado ao estresse induzido por variações sazonais e pela exposição à mistura de xenobióticos mobilizadas durante o período de chuvas (Trujillo-Jiménez et al., 2011). O aumento da LPO também é demonstrado em fígado e brânquias de peixes expostos ao herbicida glifosato (Samanta et al., 2014) e em outros tecidos (Gluszczak et al., 2007; Modesto e Martinez, 2010), em fígado expostos a 3,4-dicloroanilina (Li et al., 2003) e em cérebro e músculo expostos ao inseticida endosulfan (Ballesteros et al., 2008).

A variação na concentração da PCO e LPO e o decréscimo da GSH em L1 e L2, bem como o aumento na atividade da CAT e da GST refletem a elevada sensibilidade desses

biomarcadores às características distintas destes rios relativo aos parâmetros físicos e químicos e a provável contaminação por origem antrópica. Com exceção do trecho do REF, que é protegido por uma UC, as microbacias dos ambientes avaliados situam-se em zonas de extenso cultivo de soja, cana-de-açúcar e outras culturas menos representativas. Além disso, as microbacias estão inseridas em uma região crítica para a geração de resíduos industriais. Dos agrotóxicos de maior consumo, os herbicidas estão entre os mais utilizados, seguidos em número menor por inseticidas, fungicidas e demais categorias (IPARDES, 2013), alguns já bem conhecidos pela toxicidade aos organismos aquáticos.

O subproduto resultante da queima anual dos canaviais na região das bacias configura outra importante fonte de poluição. Nesta cultura, são utilizados também fertilizantes químicos, e agrotóxicos diversos, dentre os quais citam-se o glifosato como sendo o principal (Langowski, 2007). A queima também é responsável pela liberação do material particulado, que de acordo com Ferraz et al. (2003) possui pelo menos 40 tipos de HPAs. Dessa forma a queima de material orgânico pode constituir uma fonte antropogênica importante de HPAs para os ecossistemas locais (Lopes e Andrade, 1996).

A presença de HPAs foi constatada na bile dos indivíduos de todos os ambientes considerados. Não houve diferença significativa na quantificação de HPAs na bile, sendo que a maior concentração observada foi a de cinco e quatro anéis, e a menor de dois e seis anéis. A presença destes contaminantes na bile é um forte indício de que ocorreu a exposição dos peixes a HPAs principalmente de origem pirogênica. Estes compostos podem ser facilmente metabolizados e eliminados, mas isso não implica em menor toxicidade uma vez que seus efeitos tóxicos são dose e tempo dependentes. Os níveis de metabolitos biliares são indicativos de exposição de curta duração, o que representa uma exposição recente nos animais. Atualmente não existem dados sobre a presença destes compostos nos compartimentos dos ecossistemas em questão, contudo, a presença de HPAs na bile dos peixes é um alerta precoce para necessidade de novos estudos quantitativos em outros compartimentos, bem como a identificação de suas fontes visando prevenir uma contaminação em grau mais elevado que comprometa níveis maiores da organização biológica.

Com relação a atividade da AchE, em L1 constatou-se redução significativa em relação ao REF. A inibição da AchE vem sendo reportada em diferentes estudos que avaliam a contaminação por pesticidas e por misturas complexas (Payne et al., 1996) e é associada ao comprometimento da capacidade natatório de peixes após exposição a inseticidas (Beauvais et al., 2000). Outros estudos mostraram a inibição da atividade da AchE após exposição a formulações que contêm glifosato (Gluszczak et al., 2006; Gluszczak et al., 2007; Modesto e

Martinez, 2010; Salbego et al., 2010) em *Anguilla anguilla* após a exposição a molinato (Sancho et al. 2000) e em tecido muscular de outras espécies (Miron et al., 2005; Guimarães et al., 2007).

O aumento na atividade da AchE pode representar uma resposta adaptativa do sistema antioxidante ao processo do EO. Samanta et al. (2014) concluíram que o aumento de LPO em conjunto com a ativação da AchE indicaram o EO como efeito da exposição ao glifosato. Os autores atribuem a elevação na concentração desta enzima devido a uma acumulação do substrato acetilcolina, que ao superestimular o receptor pode conduzir à indução de LPO. O aumento da atividade desta enzima também já foi relatado no músculo e em outros tecidos de peixes expostos a herbicidas e inseticidas (Grisolia e Chambers, 1995; Miron et al., 2005; Moraes et al., 2007).

Os valores médios de MN encontrados neste trabalho quando comparados a outros estudos também conduzidos a campo mostraram níveis baixos. É importante ressaltar que a sensibilidade deste biomarcador pode variar de acordo com a espécie e seus hábitos alimentares. Aparentemente *Astyanax* sp. apresenta sensibilidade menor quando comparado a outros gêneros, e as espécies piscívoras podem ser mais sensíveis para este biomarcador (Grisolia et al., 2009). Entretanto, estudos que utilizaram somente *Astyanax* spp. (Barros, 2013; Vieira et al., 2014) demonstraram elevada variabilidade intraespecífica, constituindo o gênero um bom biomodelo a ser utilizado para biomarcadores genotóxicos.

Com relação ao ensaio cometa, *Astyanax* spp. do L2 apresentaram FD em eritrócitos significativamente menor do que os animais dos outros pontos. A frequência de MN e AN também foi menor neste grupo. No entanto nas brânquias os valores de ID e FD foram maiores do que os registrados nos animais dos demais locais. Neste caso, a maior sensibilidade das brânquias pode estar relacionada ao fato de que elas constituem um importante órgão alvo de poluentes, por estarem em contato permanente com a água e apresentarem uma área superficial grande representada pelas lamelas (Poleksic e Mitrovic-Tutundžic, 1994). Isto leva a crer que os peixes de L2 foram submetidos aos efeitos de estressores tóxicos de forma mais expressiva nas brânquias, o que condiz com uma exposição pontual e aguda. Embora sem diferença significativa, estes animais também apresentaram maior quantidade de HPAs de alto peso molar, compostos conhecidos por induzir esse tipo de lesão (Hartl et al., 2007; Andrade et al., 2004).

O ensaio cometa vêm sendo relatado como um bom biomarcador de genotoxicidade de elevada sensibilidade, até mesmo a baixas concentrações de compostos genotóxicos (Frenzilli et al., 2009). Danos no DNA são relatados em peixes de locais com sedimento

contaminados por HPAs e metais (Kosmehl et al., 2008), agrotóxicos e detergentes (Russo et al., 2004). Em laboratório danos são observados na exposição a compostos utilizados na indústria têxtil (Masuda et al., 2004) e frações de óleo diesel (Vanzella et al., 2007).

É importante ressaltar que as variáveis abióticas também atuam como fatores estressantes. Por exemplo, alguns trabalhos vêm demonstrado que a hipoxia tem efeito genotóxico severo sobre organismos aquáticos (Negreiros et al. 2011; Mustafa et al., 2014), pode alterar a expressão de genes (Gracey et al. 2001; Mustafa et al., 2014) e provocar respostas morfológicas (Sollid et al., 2003; Mustafa et al., 2011; Mustafa et al., 2014). Portanto existe a possibilidade de que os escores elevados de danos observados pelo ensaio cometa reflitam um efeito sinérgico e aditivo de estressores químicos e o efeito tóxico da baixa concentração de O₂, que no período da coleta encontrava-se inferior ao limite mínimo estabelecido pela legislação vigente no país.

De acordo com Negreiros et al. (2011) à presença de danos nos indivíduos em condições de anóxia é algo que ainda necessita de mais estudos para elucidar os mecanismos pelos quais a hipoxia conduz alterações genotóxicas e morfológicas, no entanto sugere-se que na presença de contaminantes a baixa concentração de O₂ pode comprometer adicionalmente os efeitos deletérios sobre os organismos aquáticos. Isto porque as alterações que ocorrem nas brânquias em resposta a presença de contaminantes é uma tentativa de aumentar a barreira entre a água e o sangue para evitar absorção dos compostos tóxicos, contudo dificulta ainda mais a difusão de gases, sobretudo em ambientes anóxicos. Portanto em ambientes sujeitos a hipoxia os organismos ficam mais vulneráveis a outros estressores.

Os ID e FD dos eritrócitos dos animais de todos os locais foram superiores aos das brânquias. Diferentemente desses resultados, maior quantidade de danos nas brânquias em relação a outros tecidos foram detectados pelo ensaio cometa em outros trabalhos (Sanjay et al., 2005; Sasaki et al., 2007). Os autores atribuem estes resultados ao metabolismo específico e distinto do tecido com relação a ativação ou a desintoxicação de determinados poluentes ou a reparação dos diferentes tipos de quebras no DNA.

As lesões no DNA detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção e não causam prejuízos maiores ao organismo se forem reparadas (Jha, 2008). Por se tratar de um biomarcador sensível a baixas concentrações de contaminantes (Frenzilli et al., 2009) supõem-se que uma exposição recente ou ainda as condições estressantes do ambiente natural possam explicar os ID e FD elevados observados neste trabalho, pois os danos no DNA são eficientemente reparados pelas enzimas celulares e sua medida dá uma visão momentânea do nível de EO (Collins et al., 1998). Esta possibilidade é confirmada pelos níveis de metabólitos

biliares de HPAs, que também são indicativos de exposição de curta duração. Apesar de não terem sido determinados os tipos de poluentes no sedimento e na água, pode-se inferir que a quantidade de compostos tóxicos aos quais os organismos modelos foram submetidos foi capaz de gerar quantidades moderadas de ERO, o que acionou o aumento da atividade dos mecanismos de defesa, de forma mais expressiva nos peixes de L1 e L2. O que reforça essa ideia é o fato de que menor concentração de PCO e maior quantidade de LPO foram observadas nestes animais, em particular nos animais do rio Ligeiro. De acordo com Filipak Neto (2007) os lipídios são mais sensíveis a danos oxidativos moderados do que as proteínas.

Além disso menor atividade da GSH, enquanto que maior atividade da CAT foram observadas em L2. Como a GSH é a primeira linha de defesa contra o EO (Zhang et al., 2004), maiores quantidades de ERO podem ter sido geradas nas brânquias, e o declínio da GSH corresponderia a uma reação aguda (Van der Oost et al., 2003). Estes animais também apresentaram maior quantidade de LPO, uma vez que a diminuição da concentração de GSH é muitas vezes associada a danos oxidativos às macromoléculas celulares, como a peroxidação de lipídios, o que possivelmente indica que a redução da GSH deva ter ocorrido em função da maior quantidade da geração de ERO (Lange, 2007).

As concentrações de poluentes presentes na água geralmente dependem de enriquecimento e de fenômenos de diluição causados por chuvas e pela lixiviação. O impacto sobre os organismos também é regido pelas taxas de degradação e biodisponibilidade dos contaminantes no solo ou na água que depende também de variáveis locais, climáticas e fatores físico e químicos. Por exemplo, a baixa precipitação e o fluxo menor dos rios podem ter um efeito adverso por meio da redução da diluição dos poluentes, enquanto que a precipitação elevada também pode aumentar a poluição através de maior lixiviação de poluentes do solo para os rios (Ergene et al., 2007). Sendo assim os corpos hídricos inseridos em zonas agrícolas estariam mais suscetíveis a contaminação por compostos tóxicos devido a estes fenômenos. Ao longo de sua extensão até a foz, com a exceção de um trecho do REF inserido no interior de uma Unidade de Conservação, os rios apresentam diferentes tipos de interferências antrópicas, sendo a mais representativas as zonas agrícolas. Estas regiões são críticas para uma maior exposição tóxica dos organismos aquáticos, principalmente no momento do escoamento agrícola (período de maior lixiviação) (Whitehead et al., 2004).

Aparentemente as boas condições de conservação dos atributos vegetacionais e hidrológicos dos trechos avaliados, conferem proteção aos corpos hídricos. No entanto as lesões observadas pelos ensaios genotóxicos e enzimáticos evidenciam a presença de substâncias e ou condições ambientais estressantes e, possivelmente, em alguns pontos possa ocorrer

contaminação de forma pontual e aguda. O que reforça essa constatação é o fato de que lesões histológicas reversíveis foram verificadas enquanto que as permanentes (mais severas), resultantes de uma exposição crônica, apareceram com baixa incidência nas brânquias e no fígado dos peixes.

Os índices somáticos mostraram-se menos sensíveis a estas alterações, pois não apresentaram variações entre os ambientes e nem alterações que indiquem a ocorrência de efeitos adversos sob o estado de saúde geral dos peixes. A possibilidade destes efeitos ainda não terem atingido níveis superiores da comunidade biológica é elevada, com base no fato de que os níveis maiores de organização biológica são menos sensíveis a variações no ambiente (Van der Oost et al., 2003), mais estudos contemplando estes aspectos devem ser realizados afim de testar essa hipótese

Com a aplicação do IBR verificou-se distinção entre os ambientes com relação aos biomarcadores biológicos. O local de maior similaridade ao ponto REF foi o L1. Vários biomarcadores exibiram uma resposta que foi induzida ou inibida de acordo com o local de amostragem e o arranjo espacial destes biomarcadores na figura permitiu visualizar mais claramente quais biomarcadores foram mais sensíveis a este tipo de avaliação. A boa qualidade ecológica de L1 e L2 é verificada pela diferença entre os índices em relação a um local impactado, porém em condição mais frágil do que observado no ponto referencial, assumindo que este esteja mais conservado.

A maior sensibilidade dos biomarcadores em níveis menores da organização biológica ficaram evidentes nestes resultados. As interferências, antrópicas ou naturais, podem ainda não comprometer níveis superiores da biota aquática, porém representam um alerta precoce de alterações que deverão ser avaliadas em estudos futuros uma vez que a água destes rios, em particular L2, serão captadas para o abastecimento público. Os demais parâmetros individualmente não forneceram uma previsão suficientemente confiável em relação a futuras situações de exposição ou efeitos nas comunidades biológicas. Para entender o nível de interferência, seja antrópico ou natural, que exerce em maior ou menor grau, efeitos nas condições morfofisiológicas e celulares dos organismos aquáticos, o uso combinado de indicadores em diferentes níveis de organização biológica e ecológica provou ser um instrumento eficiente para um diagnóstico mais confiável.

Deve-se destacar também que as histopatologias, em termos de importância ecológica, enquadram-se nas alterações de relevância menor, quando não observadas alterações nos índices dos maiores níveis da organização. De fato, correlações entre esses biomarcadores (histológicos e morfométricos) não foram observadas. Presume-se que estes fatores, quando

correlacionados, sugerem uma relação causal entre o aumento hepático e exposição a poluentes químicos (Sloof et al., 1983). Entretanto, a ausência de respostas no organismo e na população não é necessariamente uma falha de detecção ou de insensibilidade, mas sim pode representar que não houve efeitos tempo-dependentes. Dessa forma, a integração do conjunto de respostas de cada nível biológico foi essencial e capaz de gerar informações que permitiram entender e interpretar a relação entre os biomarcadores e situações de risco para exposição.

É geralmente aceito que a relevância ecológica está inversamente relacionada com critérios como a sensibilidade e especificidade (Zwart, 1995). Efeitos no maior nível da organização biológica (população, comunidade, etc.) têm uma relevância biológica e toxicológica muito alta, mas pode ser insensível devido à presença de vias alternativas em um ecossistema. Além disso, considerar apenas os efeitos observados em níveis hierárquicos superiores como relevantes é muito arriscado pois medidas de reversão podem ser empregadas de forma tardia e não preventiva. Neste caso, a capacidade de adaptação das espécies pode ter sido superada, e o prejuízo ultrapassado o ponto onde não se pode reverter ou reduzir os riscos

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As métricas populacionais e os índices somáticos possibilitaram a identificação de alguns aspectos importantes sobre as condições tróficas dos ambientes e o estado nutricional dos peixes. Além de demonstrarem que as condições prevalentes em todos os ambientes se encontravam dentro do intervalo de tolerância para o gênero.

As lesões observadas pelos ensaios genotóxicos, enzimáticos e histológicos, bem como as maiores concentrações de LPO, PCO e de HPAs, evidenciaram a presença de substâncias e ou condições ambientais estressantes em L1 e L2 em relação ao REF. Os índices somáticos mostraram-se menos sensíveis a estas alterações, pois não apresentaram variações entre os ambientes e nem alterações que indicassem a ocorrência de efeitos adversos sob o estado de saúde geral dos peixes. No entanto, estes resultados complementaram as respostas obtidas pelos demais biomarcadores e contribuíram para o diagnóstico ecológico confiável.

A análise do IBR distinguiu os locais em termos de vulnerabilidade ecológica, considerando para isso os dados de todos os biomarcadores, permitindo identificar os ambientes de maior similaridade ao ponto REF, sendo este o L1.

REFERÊNCIAS

- Aas E., Beyer J., Goksoyr A. **Fixed wavelength Fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity city, inner filter effect and signal interpretation.** *Biomarkers.* v. 5, p. 9-23, 2000.
- Abdel-Moneim A.M., Al-Kahtani M.A., Elmenshawy O.M. **Histopathological biomarkers in gills and liver of Oreochromis niloticus from polluted wetland environments, Saudi Arabia.** *Chemosphere,* v.88, n.8, p.1028–1035, 2012.
- Abilhoa V., Agostinho A.A. **Aspectos biológicos de duas espécies de astyanax (teleostei, characidae) em lagoas marginais do alto rio Iguazu, Paraná, Brasil** *Estud. Biol.* V.29, n.66, p.23-32, 2007.
- Adams S.M. (Editor), **Biological indicators of stress in fish.** American Fisheries Symposium 8, Bethesda, MD, 191pp. 1990a.
- Adams S.M., **Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish.** *Am. Fish. Sot. Symp.,* v.8, p.1-8, 1990b.
- Adams SM, Brown AM, Goede RW. **A Quantitative Health Assessment Index for Rapid Evaluation of Fish Condition in the Field.** *Journal: Transactions of the American Fisheries Society,* 122:1, January 1993, pages 63-73.
- Aebi, H. **Catalase in vitro.** *Meth. Enzymol.,* v.105, p.121-126, 1974.
- Akaishi F.M., Assis H.C., Jakobi S.C., Eiras-Stofella, D.R. **Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil.** *Environmental Contamination and Toxicology,* v. 253, p. 244-253, 2004.
- Alberto A., Camargo A. F., Verani J. R., Costa O. F., Fernandes M.N. **Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river.** *Ecotoxicology and Environmental Safety,* v. 61, p. 247-255, 2005.
- Almeida R.B. ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação.** Botucatu: UNESP, 2007. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biociências. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. 2007.
- Andrade V.M., Freitas T.R.O., Silva J. **Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment.** *Mutat Res* v.560, p.57-67, 2004.
- ANZECC. **Australian water quality guidelines for fresh and marine waters.** National Water Quality Management Strategy Paper No 4, Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, Canberra, 1992.
- APHA, AWWA, WPC – American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (Ed.) 20. ed. Washington: American Public Health Association. 1998.

APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

Araújo, M.L.P. **O efeito do pesticida metil-paration em *Astyanax altiparanae* (lambari) por meio de parâmetros morfológicos e bioquímicos**. Monografia (Graduação). Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

AVMA. American Veterinary Medical Association, Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2012.

Ayllon F., Garcia-Vazquez E. **Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test**. Mutation Research, v. 467, p. 177-186, 2000.

Bainy A.C.D., Saito E., Carvalho P.S.M., Junqueira V.B.C. **Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site**. Aquatic Toxicology, v.34, p.151-162, 1996.

Ballesteros M.L., Wunderlin D.A., Bistoni M.A. **Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia mutidentata* exposed to endosulfan**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 72, p. 199-205, 2009.

Barros I. T. **O uso de biomarcadores em *Astyanax* spp. de mananciais da bacia do alto rio Paraná: avaliação das características ambientais, níveis de contaminação e risco para a saúde**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá. 2013.

Beauvais S. L., Jones S. B., Brewer S. K., Little E. E. **Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures**. Environmental Toxicology and Chemistry v.19, p.1875–1880, 2000.

Beliaeff B, Burgeot T. **Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment**. Environmental Toxicology Chemistry, v.21, p.1316-1322, 2002.

Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P., Wahli T. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution**. J. Fish. Dis., v. 22, p. 25-34, 1999.

Beroya-Eitner MA. **Ecological vulnerability indicators**. Ecological Indicators, v. 60, p.329–334, 2016

Bertolucci B., Vicentini C. A., Vicentini I.B.F., Bombonato M.T.S. **Light microscopy and ultrastructure of the liver of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae)**. Acta. Sci. Biol. Sci. v. 30, n. 1, p. 73-76, 2008.

Biagianti-Risbourgl S., Vernetl G., Boulekbachez H. **Ultrastructural response of the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, sac-fry exposed to acetone**. Chemosphere, v. 36, n. 9, pp. 1911-1922, 1998.

Bombail V., Gordon A.D., Batty J. **Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland**. Chemosphere 44, p.383-392, 2001.

Bradford M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem. v. 72, p. 248-254, 1976.

Brasil. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011.

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.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]., v.66, n.2, p.593-601, 2014.

Cestari M.M., Lemos P.M.M., Oliveira-Ribeiro C.A., Costa J.R.M.A., Pelletier E., Ferraro M.V.M., Mantovani M.S, Fenocchio A.S. **Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations.** Genetics and Molecular Biology, v. 27, p. 270-274, 2004.

Collins A. R., Gedik C. M., Olmedilla B., Southon S., Bellizi M. **Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes, large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates.** FASEB J. v.12, p.1397–1400, 1998.

Cortes RMV, Hughes SJ, Pereira VR, Varandas SGP. **Tools for bioindicator assessment in rivers: The importance of spatial scale, land use patterns and biotic integration.** Ecological Indicators, v.34, p.460-477, 2013.

Crestani M., Menezes C., Gluszcak L., dos Santos Miron D., Spanevello R., Silveira A., Gonçalves F.F., Zanella R., Loro V.L. **Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern.** Chemosphere, v.67, p.2305–2311, 2007.

Dey I, Budda C., Wick T., Alver J. E., Farkas T. **Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature.** Proc. Nat. Acad. Sei., v.90, p.7498-7502, 1993.

Ellman G.L., Courtney D., Andres JR. V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. v.7, p. 88-96, 1961.

Ergene S., Çavaş T., Çelik A., Köleli N., Kaya F., Karahan A. **Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution.** Ecotoxicology, v.16, n. 4, pp 385-391, 2007.

Eufemia NA, Collier TK, Stein JE, Watson DE, DiGiulio RT. **Biochemical responses to sediment-associated contaminants in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) from the Niagara River ecosystem.** Ecotoxicology v.6, p.13-34, 1997.

Ezhilmathy R., Rajalakshmi K., Chezhian A. **Histological alterations in sea bass, *Lates calcarifer* exposed to combined stressors of pesticide and metal (Profenofos and lead nitrate).** International Journal of Research in Marine Sciences v.3, n.2, p.44-47, 2014.

Farombi E.O., Ajimoko Y.R., Adelowo O.A. **Effect of Butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African Catfish, (*Clarias gariepinus*).** Int. J. Environ. Res. Public Health, v.5, p.423-427, 2008.

Fenech M. **The *in vitro* micronucleus technique.** Mutat Res., v.455, p.81-95, 2000.

Ferraro M.V., Fenocchio A.S., Mantovani M.S., Cestari M.M., Ribeiro, C.A.O. **Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests.** Genetics and Molecular Biology, v. 27, p. 103-107, 2004.

Figueiredo-Fernandes A., Ferreira-Cardoso J. V., Garcia-Santos S., Monteiro S.M., Carrola J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A. **Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper.** Pesq. Vet. Bras. v.27, n.3, p. 103-109, 2007.

Filipak Neto, F. **Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*.** Universidade Federal do Paraná. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Curitiba, 2007.

Fontainhas-Fernandes A., Luzio A., Garcia-Santos S., Carrola J., Monteiro S. **Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water.** Braz. Arch. Biol. Technol. v.51, p.1057-1063, 2008.

Fontoura N. F., Weck C. R., Lutz M.X.T., Hoch W.R. **Dinâmica Populacional da ictiofauna da lagoa Fortaleza, Cidreira, Rio Grande do Sul. I. *Astyanax alburnus* (Hensel, 1870) (Teleostei, Characiformes, Characidae).** Biociências, v. 1, n. 1, p. 77-94, 1993.

Frenzilli G., Nigro M. Lyons BP. **The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments.** Mutation Research, vol. 681, p. 80-92, 2009

Garcia-Santos S., Monteiro S.M., Carrola J., Fontainhas-Fernandes A. **Alterações histológicas em brânquias de tilápias nilóticas *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. V.59, p.376-381, 2007.

Garcia-Santos S., Monteiro S.M., Carrola J., Fontainhas-Fernandes A. **Histopathological lesions of tilapia *Oreochromis niloticus* gills caused by cadmium.** Brazilian Journal of Veterinary Animal Sciences, v. 59, p. 376-381, 2007.

Georgieva E., Yancheva V., Velcheva I., Becheva M., Stoyanova S. **Histological alterations under metal exposure in gills of european perch (*Perca fluviatilis* L.) from topolnitsa reservoir (Bulgaria).** Arch. Biol. Sci., Belgrade, v.67, n.2, p.729-737, 2015.

Gluszczak L., Miron D.S., Moraes B.S., Simões R.R., Schetinger M.R.C., Morsch V.M., Loro V.L. **Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*).** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol., v.146, p.519–524, 2007.

Gracey A., Troll J., Somero G. **Hipoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*.** Proc Natl Acad Sci U S A. v.13, n.98, p.1993-8, 2001.

Greenfield B.K., Teh S.J., Ross J.R.M., Hunt J., Zhang G.H., Davis J.A., Ichikawa G., Crane D., Hung S.S.O., Deng D.F., Teh F.-C., Green P.G. **Contaminant concentrations and histopathological effects in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*).** Arch. Environ. Contam. Toxicol. v.55, p.270–281, 2008.

Griffith O.W. **Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.** Anal Biochem. 1980 Jul 15,106(1):207-12.

Grisolia C. K., Rivero C. L. G., Starling F. L. R. M., da Silva I. C. R., Barbosa A. C., Dorea J. G. **Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake.** Genetics and Molecular Biology, v. 32, p. 138-143, 2009.

Grisolia C.K. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução.** Editora da UNB, Brasília, 392 pp. 2005.

Grisolia C.K., Starling F.L.R.M. **Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant dischargers.** Mutat Res v.491, p.39-44, 2001.

Guimaraes A.T.B., Silva de Assis H.C., Boeger W. **The effect of trichlorfon on ~ acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish Oreochromis niloticus.** Ecotoxicol. Environ. Saf. v.68, p.57-62, 2007.

Has-Schön E., Bogut I., Strelec I. **Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of river Neretva (Croatia).** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v.50, p.545-551, 2006.

Heddle, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. Mutation Research, v. 18, p. 187-190, 1973

Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. **Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation.** Free Radic. Biol. Med., v. 19, p. 271-280, 1995.

IPARDES. **Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná/Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social.** - Curitiba: 245 p.; il.; 30 cm, 2013.

Jee, J.-H., Kang J.-C. **Biochemical Changes of Enzymatic Defense System after Phenanthrene Exposure in Olive Flounder, Paralichthys olivaceus.** Physiol. Res. v.54, p.585-591, 2005.

Jha A.N. **Ecotoxicological applications and significance of the comet assay.** Mutagenesis. v.23, n.3, p.207-21, 2008.

Jiang Z-Y., Woollard A.C.S., Wolff S.P. **Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange Comparison with the TBA assay and an iodometric method.** Lipids, v. 26, p. 853-856, 1991.

Jiang, Z-Y., Hunt J.V., Wolff S.P. **Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein.** Anal. Biochem., v. 202, p. 384-389, 1992.

Jin Y., Zhang X. Lu D. Fu Z. **Proteomic Analysis of Hepatic Tissue in Adult Female Zebrafish (Danio rerio) Exposed to Atrazine.** Arch Environ Contam Toxicol v.62, p.127-134, 2012.

Kappus H, Sies H. **Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation.** Experientia. p.1233-41, 1981.

Kawall H. G. **Efeito de águas ácidas em Gymnocorymbus ternetzy (Boulenger, 1895) (Pisces: Characidae).** Dissertação de mestrado na área de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993

Keen J. H., Habig W.H., Jakoby W.B. **Mechanism for several activities of the glutathione Stransferases.** J. Biol. Chem., v. 251, p. 6183-6188, 1976.

Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Hayashi M., Sofuni T. **A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay.** MMS Communications, v. 3, n. 2, p. 103-115, 1995.

Kosmehl T., Hallare A.V., Braunbeck T., Hollert H. **DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay.** Mut Res v.650, p.1–14, 2008.

Lackner R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (eds.) **Fish ecotoxicology.** Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224. 1998.

Lam PKS. **Use of biomarkers in environmental monitoring.** Ocean & Coastal Management, v.52, p. 348–354, 2009.

LANGE, M. V. Aspectos bioquímicos do efeito da fração solúvel do petróleo em *Astyanax* sp. Monografia, Universidade Federal do Paraná. 2007.

Langiano V.C., Martinez C.B.R. **Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*.** Comp. Biochem. Physiol. C 147, p.222–231, 2008.

Langowski E. **Queima da cana: uma prática usada e abusada.** Cianorte, 2007. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/publicacoes/etanol/efeitosDaQueimaDeCana.pdf> >. Acesso em: 22 fev. 2014.

Le Cren, ED. **The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*).** Journal of Animal Ecology v.20, p. 201-219, 1951.

Leli I. T.; Stevaux J. C.; Nóbrega M. T. DA. **Dinâmica espacial da hidrologia da bacia do rio Ivaí.** Bol. geogr., Maringá, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2010

Levesque H.M., Moon T.W., Campbell P. G. C., Hontela A. **Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field.** Aquat. Toxicol, v.60, p.257–267, 2002.

Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** Meth Enzymol v.186, p.464-78, 1990.

Lopes W. A., Andrade J. B., **Fonte, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera.** Química Nova, v.19, p.497-516, 1996.

López-López E., Sedeño-Díaz J.E., Favari P. **Lipid peroxidation and Acetylcholinesterase activity as biomarkers in the Black Sailfin Goodeid, *Girardinichthys viviparus* (Bustamante) exposed to water from Lake Xochimilco (Mexico).** Aquat. Ecosys. Healt Manag., v.9, n.3, p379-85, 2006.

Lupi C., Nhacarini N. I., Mazon A. de F., Sá O. R. de. **Evaluation of the environmental pollution in the Retiro and Consulta rivers Bebedouro - Brazil, by analyzing histopathological changes in the gills from tilapia.** Revista Fafibe On Line, n.3, 2007.

- Lushchak V.I. **Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.** *Aquat. Toxicol.*, v.101, pp.13–30, 2011.
- Machado M.R., Fanta E. **Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*.** *Braz. arch. biol. technol.* [online]. vol.46, n.3, pp. 361-372, 2003.
- Mackereth FYH, Heron JG, Talling JF. **Water analysis: some revised methods for limnologists.** Cumbria: Freshwater Biological Association/Scientific Publication 36, 1978.
- Masuda S., Deguchi Y., Masuda Y., Watanabe T., Nukaya H., Terao Y., Takamura T., Wakabayashi K., Kinae N. **Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4- [bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7- bromo- 4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3-dichloro- 5,4-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the Comet Assay.** *Mutat. Res.*, v.560, p.33–40, 2004.
- Meletti P.C., Rocha O., Martinez C.B.R. **Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes.** In: Brigante J., Espíndola, E.L.G. (Ed.). **Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu.** São Paulo: SÃO CARLOS, 2003. p.149-180.
- Miron D., Crestani M., Schetinger M.R., Morsch V.M., Baldisserotto B., Tierno M.A., Moraes G., Vieira V.L.P. **Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae).** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* V.61, p.398–403, 2005.
- Modesto K.A., Martinez C.B.R. **Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity.** *Chemosphere* v.81, p.781–787, 2010.
- Monteiro D., Rantin F., Kalinin A. **Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829).** *Ecotoxicology*, n.19, pp.105–123, 2010.
- Moraes B.S., Loro V.L., Glusczak L., Pretto A., Menezes C., Marchezan E., de Oliveira Machado S. **Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*).** *Chemosphere*, v. 68, p. 1597-1601, 2007.
- Mustafa S. A., Al-Subiai S. N., Davies S. J., Jha A. N. **Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L.** *Ecotoxicology* v.20, p.1455–1466, 2011.
- Mustafa S.A., Karieb S.S., Davies S. J., Jha A.N. **Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions.** *Mutagenesis* v. 30, n. 1, 2014.
- Muthukumaravel K., Rajaraman P. J. **A study on the toxicity of chromium on the histology of gill and liver of freshwater fish *Labeo rohita*.** *Pure Appl. Zool.*, v.12, p.122-126, 2013.
- Navarro R.D., Silva R.F., Ribeiro Filho O.P., Calado L.L., Rezende F.P., Silva C.S., Santos L.C. **Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis*, Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo.** *Zootecnia Tropical.* v. 24, p. 165-176, 2006.

Negreiros L.A., Silva B.F., Paulino M.G., Fernandes M.N. Chippari Gomes A.R. **Effects of hypoxia and petroleum on the genotoxic and morphological parameters of *Hippocampus reidi***. Comp. Biochem. Physiol. v.153, p.408-414, 2011.

Nikolski G.V. Theory of fish population dynamics. Edinburgh, Oliver and Boyd, 1969.

Nogueira L., Sanches A. L. M., Silva D. G. H., da Ferrizi V. C., Moreira A. B., Almeida E. A. de. **Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodies** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.179, p.29-36, 2016.

Nowak, B. (1992), Histological changes in gills induced by residues of endossulfan. Aquatic Toxicology, 23, 65-84.

Olufayo M.O., Alade O.H. **Acute toxicity and histological changes in gills, liver and kidney of catfish, *Heterobranchus bidorsalis* exposed to cypermethrin concentration**. African Journal of Agricultural Research v. 7, n.31, pp. 4453-4459, 2012.

Orsi M.L., Carvalho E.D., Foresti F. **Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) no médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil**. Revista Brasileira de Zoologia, v. 21, n. 2, p. 207-218, 2004.

Ortiz-Ordoñez E., Uría-Galicia E., Ruiz-Picos R.A., Duran A.G.S., Trejo Y.H. Effect of **Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis***. Arch. Environ. Contam. Toxicol., v.1, n3, p.443–452, 2011.

Pandey S., Nagpure N.S., Kumar R., Sharma S., Srivastava S.K., Verma M.S. **Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis**. Ecotoxicology and Environmental Safety v.65, n.1, p.56–61, 2006.

Paulino M.G., Benze T.P., Sadauskas-Henrique H., Sakuragui 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**. Sci. Total Environ. v.17, p.497-498, 2014.

Pauly, D. Editorial: Fishbyte Section. The ICLARMQ, v. 16 (2-3) p.26. 1993.

Payne J.F., Mathieu A., Melvin W., Fancey L.L. **Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland**. Marine Pollution Bulletin, v.32, n.2, p.225–231, 1996.

Pelt F.N. **Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L**. Mar. Environ. Res., v. 64, p. 191-208, 2007.

Pereira J.J., Lewis Jr. E.J., Spallone R.L. Sword C. **Bifurcation of gill filaments in winter flounder (*Pleuronectes americanus* Walbaum) from Long Island Sound**. J. Fish Biol. v.41, p. 327-338, 1992.

Poleksic V., Mitrovic-Tutundzic V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: R. Muller and R. Lloyd (editors). Sublethal and chronic effects of pollution on freshwater fish**. FAO Fishing News Books, pp. 339-352, 1994.

Poletta G.L., Simoniello M.F., Mudry M.D. **Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in Caiman latirostris blood.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, v. 179, p.29-36, 2016.

Power A., Sheehan D. **Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*** *Comp. Biochem. Physiol. C*, v.114, n.2, pp.99–103, 1996.

Quinlan G.J., Gutteridge J.M.C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: Taniguchi N., Gutteridge J.M.C. **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species.** England: Oxford University Press, p. 257- 258, 2000.

Rabitto I.S., Alves Costa J.R.M., Silva de Assis H.C., Pelletier É., Akaishi F.M., Anjos A., Randi M.A.F., Oliveira Ribeiro C.A.. **Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopatological and biochemical findings.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, p. 147-156, 2005.

Ramsdorf, W. A.; Guimarães, F. S. F.; Ferraro, M. V. M.; Gabardo, J.; Trindade, E. S.; Cestari, M. M. **Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry.** *Mutation Research*, 673: 78-81, 2009b.

Rathod N. D., **Histopathology of Gills in *Cirrhinus reba* (ham-buch) Exposed to Paraquat Dichloride.** *Int. J Biotech. & Bio-sci.*, v.1, n.1, 2011.

Ribeiro O. C. A.; Turcatti N. M. Carvalho C. S.; Cardoso R. I. ; Fanta E. **Efeito Tóxico do HgCl₂ na Estrutura dos Arcos Branquiais de *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei).** II Simpósio Sobre Meio Ambiente, Universidade Salgado Oliveira, v. 1, n.1, p. 15-24, 1994.

Russo C., Rocco L., Morescalchi M.A., Stingo V. **Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments.** *Ecotoxicol Environ Safety.*, v.57, p.168–174, 2004.

Salbego J., Pretto A., Gioda C. R., Menezes C. C., Lazzari R., Radünz Neto J., Baldisserotto B., Loro V. L. **Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*).** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.58, p.740-745, 2010.

Salvagni J., Ternus R. Z., Fuentefria, A. M. **Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil.** *Genet. Mol. Biol.* [online]. vol.34, n.1, pp.122-126, 2011.

Samanta P., Pal S., Mukherjee A. K., Ghosh A. R. **Evaluation of Metabolic Enzymes in Response to Excel Mera 71, a Glyphosate-Based Herbicide, and Recovery Pattern in Freshwater Teleostean Fishes.** *BioMed Research International*, v.6, 2014.

Sanchez W, Burgeot T, Porcher J. **A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept.** *Environmental Science Pollution Research*, v.20, p.2721-2725, 2013.

Sanchez W, Porcher JM. **Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive.** *TRAC-Trend Anal Chem* v.28, p.150-158, 2009.

Sancho E., Cerón J.J., Ferrando M.D. **Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla***. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.46, p.81–86, 2000.

Sasaki Y.F., Nakamura T., Kawaguchi S. **What is better experimental design for in vitro comet assay to detect chemical genotoxicity?** AATEX 14, Special Issue, 499-504 Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences p.21-25, 2007.

Schmid W. **The micronucleus test**. *Mutat Res.* V.31, n.1, p.9-15, 1975.

Schulz U.H., Martins-Junior H. ***Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil**. *Braz. J. Biol.*, v.61, n.4, p.615-622, 2001.

Sedlak J., Lindsay R.H., **Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent**. *Anal. Biochem.*, v. 25, p. 192-205, 1968.

Shibatta O. A., Hoffmann A. C. **Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jenyns) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil**. *Revista Brasileira de Zoologia*. v. 22, n. 2, p. 366-371, 2005.

Silva de Assis, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. Julho, Tese (doutorado) Universidade Técnica de Berlim, Alemanha. 1998.

Silva G.C., Castro A.C.L.E, Gubiani E.A. **Estrutura populacional e indicadores reprodutivos de *Scomberomorus brasiliensis* Collette, Russo e Zavala-Camin, 1978 (Perciformes: Scombridae) no litoral ocidental maranhense**. *Acta Scientiarum. Biological Science*, v. 27, n. 4, p. 383-389, 2005.

Simonato J. D., Guedes C.L.B., Martinez C.B.R. **Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.69, 1, p.112-120, 2008.

Sloof W., Canton J.H., Hennens J.L.M. **Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. 1. (sub)acute toxicity tests**. *Aquat. Toxicol.*, v.4, p.113-28, 1983.

Sol S.Y., Johnson L.L., Boyd D., Olson O.P., Lomax D.P., Collier T.K. **Relationships between anthropogenic chemical contaminant exposure and associated changes in reproductive parameters in male English sole (*Parophrys vetulus*) collected from Hylebos Waterway, Puget Sound, Washington**. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v55, p.627–638, 2008.

Sollid J., De Angelis P., Gundersen K., Nilsson G. **Hypoxia induced adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills**. *J. Exp. Biol.* v.206, p.3667-3673, 2003.

Speit G., Hartmann A. **The comet assay (singlecell gel test), a sensitive test for the detection of DNA damage and repair**. In: Henderson, D. S. (Ed.), **Methods in molecular biology: DNA repair protocols- eukaryotic systems**. Totowa: Human. 1999. p. 203-211.

Spies R.B., Stegeman J.J., Hinton D.E., Woodin B., Smolowitz R., Okihiro M., Shea D. **Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel**. *Aquat. Tox.*, v.34, p.195-219, 1996.

- Spies R.B., Stegeman J.J., Hinton D.E., Woodin B., Smolowitz R., Okihiro M., Shea D. **Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara channel** *Aquat. Toxicol.*, v.34, p. 195–219, 1996.
- Stentiford G.D., Longshaw M., Lyons B.P., Jones G., Green M., Feist S.W. **Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants.** *Marine Environm. Resea.*, v.55, p.137-159, 2003.
- Straus D.L., Chambers J.E. **Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifod, parathion, and S,S,S-tributyl phosphotrithioate (DEF).** *Aquatic Toxicology*, v. 33, p. 311-324, 1995.
- Teh S. J., Adams S. M., Hinton D. E. **Histopathologic biomarhers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress.** *Aquatic Toxicology*, v. 37, p. 51 – 70, 1997.
- Teh S.J., Adams S.M., Hinton D. E. **Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress** *Aquatic Toxicology* v.37, p.51-70, 1997.
- Tejeda-Vera R., López-López E., Sedeño-Díaz J. E. **Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameba River, Mexico.** *Environment International*, v.33, p.521-531, 2007.
- Triebkorn R., Telcean I., Casper H., Farkas A., Sandu C., Stan G., Colarescu O., Dori T., Köhler H.-R. **Monitoring pollution in River Mures, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish.** *Environ. Monit. Assess.* 141, 177–188,2008.
- Trujillo-Jiménez P., Sedeño-Díaz J. E., Camargo J. A., López-López E. **Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860).** *Ecological Indicators*, 2011.
- Udroiu I. **The micronucleus test in piscine erythrocytes.** *Aquat Toxicol* v.79, p.201-204, 2006.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.13, n.2, p. 57-149. 2003.
- Vanzella T.P., Martinez C.B.R., Cólus I.M.S. **Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species.** *Mutation Research* v.631, p.36–43, 2007.
- Vasseur P, Cossu-Leguille C. **Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety.** *Environment International*, v.28, p.711-717, 2003.
- Vasylykiv O. Y., Kubrak O.I., Storey K. B., Lushchak V.I. **Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole.** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.101, n.1, p.1–5, 2011.
- Vazzoller AEA de M. **Manual e métodos para estudos biológicos de populações de peixes. Reprodução e Crescimento.** Brasília, CNPq, Programa Nacional de Zoologia, 108p. 1981.
- Vidhya V., Radhakrishnan N.C. **Histopathological Changes Observed in the Gills of *Etrophus suratensis* Exposed to Pyrethroid Insecticide, Lambda-Cyhalothrin.** *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, v.1, n.1, p.39-42, 2013.

Vieira C.E.D., Almeida M. da S., Galindo, B. A., Pereira L., Martinez, C. B.dos R. **Integrated biomarker response index using a neotropical fish to assess the water quality in agricultural áreas.** Neotropical Ichthyology, v. 12, p. 153-164, 2014.

Vigário A.F., Sabóia-Morais S.M.T. **Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*.** Pesq Vet Bras, v.34, n.6, p.523-528, 2014.

Weatherley AH, Gill HS. **The Biology of Fish Growth.** London, Academic Press, 443p. 1987.

Whitehead A., Kuivila K.M., Orlando J.L., Kotelevtsev S., Anderson S.L. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. Environmental Toxicology and Chemistry, v.23, n.12, pp.2868–2877, 2004

Winkaler E.U., Silva A.G., Galindo H.C., Martinez C.B.R. **Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná.** Acta Scientiarum, v.23, p.507-514, 2001.

Yang X. **Use of fish biomarkers to assess the contaminant exposure and effects in lake erie tributaries.** Dissertação de Doutorado, Ohio State University, 150 pp. 2004.

Yasser A.G, Naser M.D. **Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study.** Environ Monit Assess. v.181, p.175-82, 2011.

Zhang H., Davison W., Knight B., Mcgrath S. **In situ measurements of solution concentration and fluxes of trace metals in soils using DGT.** Environ. Sci. Technol., v. 32, p. 704-710, 1998.

Zwart D. de. **Monitoring water quality in the future.** vol 3. Biomonitoring, Bilthoven, The Netherlands: Biomonitoring, National Institute of Public Health and Environmental Protection Bilthoven, The Netherlands, ISBN 90–802637–3–7.1995.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação do protocolo de avaliação rápida (PAR) adaptado ao arenito Caiuá, possibilitou a caracterização do ambiente no que se refere aos atributos físicos do *habitat*. O ambiente de maior conservação foi o referencial (rio dos Índios), o que evidencia o efeito protetivo das áreas destinadas a conservação integral. O local 1 (rio Bolivar), sendo este um manancial de abastecimento público e, portanto, sob leis de proteção conferidas pela instituição de APAs nestes ambientes, não apresentou as mesmas condições de conservação. A criação de áreas de proteção ambiental – APAs, são mecanismos importantes para proteção de mananciais e outras áreas prioritárias para as comunidades humanas, mas talvez não tenham o mesmo efeito com relação ao seu objetivo primordial, que inclui, além dos aspectos de interesse humano, a conservação de processos naturais e da biodiversidade.

Verificou-se a necessidade de incluir ações de conservação que visem:

- Identificar interferências de origem antrópica que possam acentuar os efeitos de estressores naturais nos ambientes em questão, uma vez que são mais vulneráveis a degradação devido aos fenômenos de erosão inerentes ao tipo de solo da região, e que comprometem adicionalmente a toxicidade dos processos de contaminação dos corpos hídricos.

Além disso, propõem-se como medidas de conservação:

- Implantação de um plano de gestão ambiental visando a preservação dos recursos hídricos das microbacias que contemple a aplicação do PAR adaptado ao arenito Caiuá ao longo da extensão dos corpos hídricos em questão. Isso possibilitará a identificação de pontos de maior risco para degradação e áreas mais vulneráveis, dessa forma ações de conservação poderão ser priorizadas e direcionadas e, portanto, mais efetivas.
- Considerando que a aplicação do protocolo se limitou a locais previamente selecionados com boas características de conservação, sugere-se que os resultados deste trabalho sejam utilizados como mecanismo de sensibilização da população regional, uma vez que os trechos não avaliados podem apresentar um grau de comprometimento superior ao das áreas estudadas.

O uso de biomarcadores em conjunto com outras metodologias de análises ambientais, contemplando níveis da organização biológica diferentes, foram fundamentais na obtenção de um diagnóstico ecológico de maior confiabilidade e precisão. Cada ferramenta utilizada, considerando suas limitações e sensibilidade, contribuiu essencialmente para chegar a este diagnóstico final. Portanto, o uso integrado de indicadores ecológicos e biomarcadores

toxicológicos, além dos parâmetros de qualidade de água tradicionais, provaram ser um instrumento valioso e indispensável para a avaliação da qualidade ambiental.

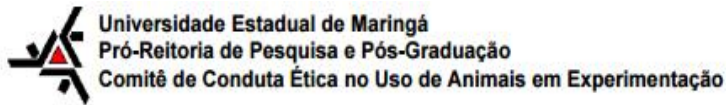
Os biomarcadores de maior sensibilidade, ou seja, aqueles nos níveis menores da organização biológica, foram capazes de expressar com clareza a toxicidade dos ambientes, sobretudo em L1 e L2. Este deve ser encarado como um alerta antecipado, pois quando os mecanismos de desintoxicação falham, em situações de exposição a contaminantes e estresse persistente, os processos de adaptação podem ser insuficientes para evitar a toxicidade, o que configura uma ameaça à sobrevivência das populações e até mesmo à diversidade de espécies.

A hipótese de que os biomarcadores em hierarquias biológicas inferiores (moleculares e bioquímicas) são mais sensíveis do que àqueles em hierarquias superiores (fisiológica, citológica e organismo) foi aceita, apesar disso, os índices superiores (IHS, IGS e K) e os parâmetros populacionais revelaram aspectos importantes sobre o estado nutricional dos peixes, e possibilitaram inferências sobre a toxicidade com relação ao tempo e o alcance de efeitos adversos. Os biomarcadores nos níveis inferiores foram eficientemente capazes de refletir a vulnerabilidade dos ambientes em questão, ainda que não tenha sido possível estabelecer uma relação de especificidade entre os efeitos (respostas) e os estressores.


Este trabalho é o primeiro que se tem conhecimento envolvendo uma abordagem integradora de biomarcadores em multinível em riachos da região do arenito Caiuá. Os resultados irão subsidiar adoção de medidas em apoio a outros mecanismos de controle ambiental, uma vez que possibilitou a identificação de uma condição estressante para os peixes da região.

Recomenda-se a adoção de ações e medidas que incluam o conceito de biomonitoramento e o uso combinado de biomarcadores a médio e longo prazo, priorizando a identificação das interferências antrópicas com o intuito de prevenir um comprometimento maior da qualidade e quantidade da água dos mananciais. Sobretudo por haver a necessidade de ampliar o potencial de captação deste recurso nas regiões que são críticas para contaminação. Esforços também devem ser direcionados à preservação e conservação dos aspectos ecológicos dos ecossistemas em questão, uma vez que quando estes estão assegurados a renovação e a qualidade de seus recursos serão mantidos naturalmente.

APÊNDICE A – Protocolo aprovado pelo Comitê de Conduta no uso de animais em experimentação da UEM (112/2011-CEUA/UEM)



Parecer emitido após reunião realizada em: 6 /12/2011 Parecer nº 112/2011

Pesquisador: Evanilde Benedito	Setor: DBI	
Título:	Protocolo nº 053/2011	
O uso de biomarcadores em peixes no monitoramento das características ambientais e ecológicas de mananciais de abastecimento público e do Parque Nacional de Ilha Grande - Paraná - Brasil		
Entrada: 28/9/2011	Início: 24/10/2011	Término: 30/9/2013
Situação do Projeto:	Aprovado	
Relatório Final:	<p>ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e a p r o v a ç ã o d o r e l a t ó r i o f i n a l .</p>	
Considerações e Parecer:	<p>A pesquisadora respondeu adequadamente aos esclarecimentos solicitados.</p> <p>Por julgar que o presente projeto de pesquisa está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, é o parecer que o mesmo seja APROVADO. A pesquisadora, no entanto, deverá obter autorização do IAP/IBAMA para coleta dos animais a este comitê antes do início da pesquisa.</p>	
 Prof. Dr. GENTIL PININI DE MORAES, Presidente em exercício do CEAE.		

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

- I - aprovado;
- II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
- III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
- IV - não aprovado

APÊNDICE B – Metodologia histológica e eletrônica de varredura

MICROSCOPIA DE LUZ

Fixação

- As porções de fígado e brânquia foram fixadas em:

ALFAC (para cada 100ml de solução fixadora):

85 ml Álcool 80%

10 ml Formaldeído 40%

5 ml ácido acético glacial (momentos antes de fixar).

Tempo: mínimo de 16 horas, máximo de 20horas.

Desidratação tempo mínimo de permanência nos banhos

Álcool 70% mínimo de 1h, podendo o material ser armazenado neste.

Álcool 80% 1h

Álcool 90% 1h

Álcool 95% 1h

Álcool 100% 30min

Álcool 100% 30 min

Diafanização

Xilol I (100%) 5min

Xilol II (100%) 5min

Inclusão

Paraplast (58°C) 2h

COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

Desparafinização

Xilol I 5min

Xilol II 5min

Hidratação

Álcool 100% 5min

Álcool 90% 5min

Álcool 80% 5min

Álcool 70% 5min

Álcool 50% 5min

Água destilada 5min

Coloração

Hematoxilina 1min

Água corrente até sair limpo

Eosina 30 seg

Água corrente até sair limpo

Enxágue rápido em água destilada

Desidratação

Álcool 70% 2min

Álcool 80% 2min

Álcool 90% 30seg

Álcool 95% 30seg

Álcool 100% I 2min

Álcool 100% II 2min

Montagem

Xilol I 5min

Xilol II 5min

Resina Permout @ e lamínula

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Fixador

Glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M, ph 7.2- 7.4 durante 24 h.

Desidratação (Utilizar álcool Merck ou equivalente)

Álcool 70% 10 min

Álcool 80% 10 min

Álcool 90% 10 min

Álcool 95% 10 min

Álcool 100% 10 min

Álcool 100% 10 min

Submeter ao ponto crítico (CO₂ líquido)

Metalizar com ouro.

ANEXO 1 - Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011

Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA, no uso das competências que lhe são conferidas pelos arts. 6º , inciso II e 8º , inciso VII, da Lei no 6.938, de 31 de agosto de 1981, regulamentada pelo Decreto no 99.274, de 6 de junho de 1990 e suas alterações, tendo em vista o disposto em seu Regimento Interno, e

Considerando a vigência da Resolução CONAMA no 274, de 29 de novembro de 2000, que dispõe sobre a balneabilidade;

Considerando o art. 9º , inciso I, da Lei no 9.433, de 8 de janeiro de 1997, que instituiu a Política Nacional dos Recursos Hídricos, e demais normas aplicáveis à matéria;

Considerando que a água integra as preocupações do desenvolvimento sustentável, baseado nos princípios da função ecológica da propriedade, da prevenção, da precaução, do poluidor-pagador, do usuáripagador e da integração, bem como no reconhecimento de valor intrínseco à natureza;

Considerando que a Constituição Federal e a Lei no 6.938, de 31 de agosto de 1981, visam controlar o lançamento no meio ambiente de poluentes, proibindo o lançamento em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida;

Considerando que o enquadramento expressa metas finais a serem alcançadas, podendo ser fixadas metas progressivas intermediárias, obrigatórias, visando a sua efetivação;

Considerando os termos da Convenção de Estocolmo, que trata dos Poluentes Orgânicos Persistentes POPs, ratificada pelo Decreto Legislativo no 204, de 7 de maio de 2004;

Considerando ser a classificação das águas doces, salobras e salinas essencial à defesa de seus níveis de qualidade, avaliados por condições e padrões específicos, de modo a assegurar seus usos preponderantes;

Considerando que o enquadramento dos corpos de água deve estar baseado não necessariamente no seu estado atual, mas nos níveis de qualidade que deveriam possuir para atender às necessidades da comunidade;

Considerando que a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico aquático, não devem ser afetados pela deterioração da qualidade das águas;

Considerando a necessidade de se criar instrumentos para avaliar a evolução da qualidade das águas, em relação às classes estabelecidas no enquadramento, de forma a facilitar a fixação e controle de metas visando atingir gradativamente os objetivos propostos;

Considerando a necessidade de se reformular a classificação existente, para melhor distribuir os usos das águas, melhor especificar as condições e padrões de qualidade requeridos, sem prejuízo de posterior aperfeiçoamento; e

Considerando que o controle da poluição está diretamente relacionado com a proteção da saúde, garantia do meio ambiente ecologicamente equilibrado e a melhoria da qualidade de vida, levando em conta os usos prioritários e classes de qualidade ambiental exigidos para um determinado corpo de água; resolve: Art. 1º Esta Resolução dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.

CAPÍTULO I DAS DEFINIÇÕES

Art. 2º Para efeito desta Resolução são adotadas as seguintes definições: 1

I - águas doces: águas com salinidade igual ou inferior a 0,5 ‰;

II - águas salobras: águas com salinidade superior a 0,5 ‰ e inferior a 30 ‰;

III - águas salinas: águas com salinidade igual ou superior a 30 ‰;

IV - ambiente lêntico: ambiente que se refere à água parada, com movimento lento ou estagnado;

V - ambiente lótico: ambiente relativo a águas continentais moventes;

VI - aquicultura: o cultivo ou a criação de organismos cujo ciclo de vida, em condições naturais, ocorre total ou parcialmente em meio aquático;

VII - carga poluidora: quantidade de determinado poluente transportado ou lançado em um corpo de água receptor, expressa em unidade de massa por tempo;

VIII - cianobactérias: microorganismos procarióticos autotróficos, também denominados como cianofíceas (algas azuis) capazes de ocorrer em qualquer manancial superficial especialmente naqueles com elevados níveis de nutrientes (nitrogênio e fósforo), podendo produzir toxinas com efeitos adversos a saúde;

IX - classe de qualidade: conjunto de condições e padrões de qualidade de água necessários ao atendimento dos usos preponderantes, atuais ou futuros;

X - classificação: qualificação das águas doces, salobras e salinas em função dos usos preponderantes (sistema de classes de qualidade) atuais e futuros;

XI - coliformes termotolerantes: bactérias gram-negativas, em forma de bacilos, oxidase-negativas, caracterizadas pela atividade da enzima β -galactosidase. Podem crescer em meios contendo agentes tenso-ativos e fermentar a lactose nas temperaturas de 44º - 45ºC, com produção de ácido, gás e aldeído. Além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, ocorrem em solos, plantas ou outras matrizes ambientais que não tenham sido contaminados por material fecal;

XII - condição de qualidade: qualidade apresentada por um segmento de corpo d'água, num determinado momento, em termos dos usos possíveis com segurança adequada, frente às Classes de Qualidade;

XIII - condições de lançamento: condições e padrões de emissão adotados para o controle de lançamentos de efluentes no corpo receptor;

XIV - controle de qualidade da água: conjunto de medidas operacionais que visa avaliar a melhoria e a conservação da qualidade da água estabelecida para o corpo de água;

XV - corpo receptor: corpo hídrico superficial que recebe o lançamento de um efluente;

XVI - desinfecção: remoção ou inativação de organismos potencialmente patogênicos;

XVII - efeito tóxico agudo: efeito deletério aos organismos vivos causado por agentes físicos ou químicos, usualmente letalidade ou alguma outra manifestação que a antecede, em um curto período de exposição;

XVIII - efeito tóxico crônico: efeito deletério aos organismos vivos causado por agentes físicos ou químicos que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele;

XIX - efetivação do enquadramento: alcance da meta final do enquadramento;

XX - enquadramento: estabelecimento da meta ou objetivo de qualidade da água (classe) a ser, obrigatoriamente, alcançado ou mantido em um segmento de corpo de água, de acordo com os usos preponderantes pretendidos, ao longo do tempo;

- XXI - ensaios ecotoxicológicos: ensaios realizados para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos a diversos organismos aquáticos;
- XXII - ensaios toxicológicos: ensaios realizados para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos a diversos organismos visando avaliar o potencial de risco à saúde humana;
- XXIII - escherichia coli (E.Coli): bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae caracterizada pela atividade da enzima β -glicuronidase. Produz indol a partir do aminoácido triptofano. É a única espécie do 2 grupo dos coliformes termotolerantes cujo habitat exclusivo é o intestino humano e de animais homeotérmicos, onde ocorre em densidades elevadas;
- XXIV - metas: é o desdobramento do objeto em realizações físicas e atividades de gestão, de acordo com unidades de medida e cronograma preestabelecidos, de caráter obrigatório;
- XXV - monitoramento: medição ou verificação de parâmetros de qualidade e quantidade de água, que pode ser contínua ou periódica, utilizada para acompanhamento da condição e controle da qualidade do corpo de água;
- XXVI - padrão: valor limite adotado como requisito normativo de um parâmetro de qualidade de água ou efluente;
- XXVII - parâmetro de qualidade da água: substâncias ou outros indicadores representativos da qualidade da água;
- XXVIII - pesca amadora: exploração de recursos pesqueiros com fins de lazer ou desporto;
- XXIX - programa para efetivação do enquadramento: conjunto de medidas ou ações progressivas e obrigatórias, necessárias ao atendimento das metas intermediárias e final de qualidade de água estabelecidas para o enquadramento do corpo hídrico;
- XXX - recreação de contato primário: contato direto e prolongado com a água (tais como natação, mergulho, esqui-aquático) na qual a possibilidade do banhista ingerir água é elevada;
- XXXI - recreação de contato secundário: refere-se àquela associada a atividades em que o contato com a água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir água é pequena, como na pesca e na navegação (tais como iatismo);
- XXXII - tratamento avançado: técnicas de remoção e/ou inativação de constituintes refratários aos processos convencionais de tratamento, os quais podem conferir à água características, tais como: cor, odor, sabor, atividade tóxica ou patogênica;
- XXXIII - tratamento convencional: clarificação com utilização de coagulação e floculação, seguida de desinfecção e correção de pH;
- XXXIV - tratamento simplificado: clarificação por meio de filtração e desinfecção e correção de pH quando necessário;
- XXXV - tributário (ou curso de água afluyente): corpo de água que flui para um rio maior ou para um lago ou reservatório;
- XXXVI - vazão de referência: vazão do corpo hídrico utilizada como base para o processo de gestão, tendo em vista o uso múltiplo das águas e a necessária articulação das instâncias do Sistema Nacional de Meio Ambiente-SISNAMA e do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos-SINGRH;
- XXXVII - virtualmente ausentes: que não é perceptível pela visão, olfato ou paladar; e
- ~~XXXVIII - zona de mistura: região do corpo receptor onde ocorre a diluição inicial de um efluente.~~
(Revogado pela Resolução 430/2011)

Art.3o As águas doces, salobras e salinas do Território Nacional são classificadas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em treze classes de qualidade.

Parágrafo único. As águas de melhor qualidade podem ser aproveitadas em uso menos exigente, desde que este não prejudique a qualidade da água, atendidos outros requisitos pertinentes.

Seção I Das Águas Doces

Art. 4o As águas doces são classificadas em:

I - classe especial: águas destinadas: a) ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; 3 b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e, c) à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.

II - classe 1: águas que podem ser destinadas: a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA no 274, de 2000; d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e e) à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

III - classe 2: águas que podem ser destinadas: a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA no 274, de 2000; d) à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e e) à aquicultura e à atividade de pesca.

IV - classe 3: águas que podem ser destinadas: a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; c) à pesca amadora; d) à recreação de contato secundário; e e) à dessedentação de animais.

V - classe 4: águas que podem ser destinadas: a) à navegação; e b) à harmonia paisagística.

Seção II Das Águas Salinas

Art. 5o As águas salinas são assim classificadas:

I - classe especial: águas destinadas: a) à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.

II - classe 1: águas que podem ser destinadas: a) à recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA no 274, de 2000; b) à proteção das comunidades aquáticas; e c) à aquicultura e à atividade de pesca.

III - classe 2: águas que podem ser destinadas: a) à pesca amadora; e b) à recreação de contato secundário.

IV - classe 3: águas que podem ser destinadas: 4 a) à navegação; e b) à harmonia paisagística.

Seção II Das Águas Salobras

Art. 6o As águas salobras são assim classificadas:

I - classe especial: águas destinadas: a) à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e, b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.

II - classe 1: águas que podem ser destinadas: a) à recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA no 274, de 2000; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) à aquicultura e à atividade de pesca; d) ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado; e e) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e

que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, e à irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto.

III - classe 2: águas que podem ser destinadas: a) à pesca amadora; e b) à recreação de contato secundário.

IV - classe 3: águas que podem ser destinadas: a) à navegação; e b) à harmonia paisagística.

ANEXO 2 - Instruções aos autores - Ambiagua

Escopo e Política

AMBIAGUA é publicada em Inglês, Português e Espanhol, e aceita submissões de manuscritos inéditos nas áreas temáticas científicas interdisciplinares relacionadas com Ciências Ambientais, Recursos Hídricos, Hidrologia, Hidrogeologia, Engenharia Ambiental e Saneamento, Engenharia Florestal e Recursos Florestais, Ecologia, Aqüicultura, Oceanologia e Recursos Pesqueiros, Agronomia, Agrometeorologia e Engenharia Agrícola, Mudanças Globais, Engenharia de Pesca e Zootecnia, Geografia, Geologia, sensoriamento remoto, Geoinformação e Análise Espacial relacionadas com a água ou Ciências Ambientais.

Artigos de revisão só serão publicados se eles incluem a análise crítica substancial dos últimos tópicos relevantes.

Os trabalhos devem ser originais e apresentado exclusivamente ao AMBIAGUA. (Revista Ambiente & Água - Revista Interdisciplinar de Ciências Aplicadas).

AMBIAGUA Processo de Avaliação

Cada proposta será revisto pelo editor para verificar se ou não o seu conteúdo se enquadra no foco da revista e se foram elaboradas de acordo com as instruções pendentes. O editor poderá rejeitar o artigo se ele determina uma falta de cumprimento das instruções, inadequado descrição textual, má conduta científica (plágio), ou se o manuscrito tem mérito científico ou tecnológico insuficiente. Quando esse processo for concluído, o editor pode enviar o artigo para um ou dois membros do Comitê Editorial, para que eles possam recomendar pelo menos dois revisores para a apresentação. Os revisores serão cientistas que trabalham em áreas estreitamente relacionadas com a área de assunto do manuscrito e, portanto, estarão plenamente capacitados para avaliar o manuscrito e recomendar a aceitação ou rejeição. Em muitos casos, eles vão sugerir melhorias a fim de tornar o manuscrito aceitável para publicação. Os revisores receberão o manuscrito junto com instruções relativas ao processo de avaliação e um formulário de avaliação onde eles podem escrever seus comentários e recomendações sobre a aceitação, correção ou rejeição do manuscrito. O (s) autor das observações não são identificados para os revisores, nem os revisores aos autores.

Os revisores considerarão rigorosamente todos os critérios sugeridos no formulário de avaliação e examinarão a qualidade e exactidão da apresentação.

Ao receber as recomendações dos revisores, o editor tem várias opções. Ele pode aceitar o artigo com pequenas mudanças e, conseqüentemente, devolver o trabalho aos autores com uma lista das correções a serem implementadas. Caso contrário, ele pode optar por enviar a versão editada do manuscrito de volta aos revisores do artigo. Os revisores também pode pedir para ver o manuscrito após a implementação do autor de seus / suas sugestões.

Quando a versão final aceitável do manuscrito é recebido pelo editor, ele vai confirmar a sua aceitação a todos os autores. Ao mesmo tempo, todos os autores receberão provas a serem devolvidos por via electrónica no prazo de 48 horas pelo autor correspondente. Quando um autor retorna as correções finais antes que o artigo é publicado, ele / ela implicitamente autoriza a publicação e confirma a singularidade do artigo.

Erros de edição, referências mencionadas no texto que não aparecem na lista de referências e pequenas discrepâncias entre o Inglês e resumos portugueses são exemplos de pequenas mudanças. Quando forem necessárias modificações maiores, o editor devolverá o artigo com uma lista de sugestões que o autor correspondente deve implementar antes do manuscrito pode ser considerada. Exemplos de modificações maiores incluem análise de dados usando provas estatísticas, revisão substancial de tabelas

e figuras, repetição de experimentos, revisão da conclusão observações ou alterações substanciais no idioma do texto.

Em caso de rejeição, após revisão pelos pares, o editor pode informar os autores os motivos da recusa. Em geral, os motivos para rejeição envolvem o conteúdo do artigo não apropriado para a revista, violações graves da forma de publicação, manuscritos e sem mérito científico e tecnológico.

Os manuscritos que foram publicados em anais de simpósios, conferências, etc., bem como artigos traduzidos de revistas estrangeiras, não devem ser apresentadas. Apresentações em encontros científicos e publicações de resumos única não se opõem a submissão.

O público-alvo desta revista científica é a comunidade acadêmica de pós-graduação, bem como de instituições de pesquisa, especialmente aqueles em Interdisciplinar Ambiental e Recursos Hídricos.

Forma e preparação de manuscritos

I - Os manuscritos submetidos devem ser originais, destinados exclusivamente à Ambi-Agua (Revista Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science).

II - O manuscrito deve ser escrito preferencialmente em Inglês, mas também em Português ou Espanhol pode ser aceite.

Todas as submissões tem que ser através do sistema, depois de registrar como um autor em: <http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/user/register>.

III - Os manuscritos dirigidas a esta revista será avaliada pelo Comitê e pares revisores Editorial, de acordo com sua especialidade, seguindo os critérios:

- a) conteúdo técnico científico;
- b) relevância científica;
- c) Clareza e qualidade do texto;
- d) qualidade e adequação do conteúdo teórico.

Por favor, esteja ciente de que será considerado não ético retirar uma apresentação antes da decisão final da Comissão Editorial.

IV - Em cada edição, o Comitê Editorial selecionará, dentre os manuscritos favoráveis, aquelas que serão publicados com base nos critérios acima. Não há compromisso com a sequência de apresentação ou tempo para uma decisão editorial. Isto depende da resposta do revisor e autor do e também sobre as tarefas e as limitações de administração.

Publicação de um resumo ou uma apresentação oral em um evento científico não deve impedir a apresentação, mas eles devem fornecer informações substanciais sabia para ser aceite. Artigos traduzidos não são aceitáveis e artigo de revisão crítica poderia ser excepcionalmente aceite.

Como formatar o texto:

O manuscrito deve ser apresentado no formato de texto (MS Office), não está restrito por senha para permitir edição. A publicação final será em pdf, html e xml. O manuscrito deve ser apresentado com as seguintes características:

Tamanho da página: equivalente ao tamanho de folha A4 (210 x 297 mm);

Margens (superior, inferior, esquerda e direita): 2,5 cm;

Tipo de fonte: Times New Roman, 12, espaço simples simples entre linhas-, em uma única coluna, os parágrafos são alinhados à esquerda e à direita;

Tamanho do manuscrito: mais importante na avaliação é a qualidade ea ciência contribuição de submissão. Normalmente, um manuscrito deverá ter um máximo de 10 páginas, incluindo tabelas e figuras (máximo de cinco todos juntos). Longer manuscrito são aceitos, no entanto, será cobrado um valor por página adicional contado após o manuscrito foi aceite para publicação e layout pronto.

Manuscritos em Português ou em espanhol, título, resumo e palavras-chave também devem ser escritos em Inglês; e manuscritos em espanhol, título, resumo e palavras-chave também devem ser escritos em Português.

Primeira página: deverá conter apenas o título do manuscrito, sem o nome do autor, afiliação institucional, nem e-mail, seguido de resumo e palavras-chave, separadas por "dois pontos" e um período no final.

Tabelas e Figuras: devem ser numeradas com números arábicos consecutivos, citadas no texto apenas antes de aparecer no manuscrito (primeira letra em maiúscula). Portanto, eles devem aparecer no texto, assim como o formato final dos artigos publicados (por favor, verifique os artigos publicados). Legenda das figuras deverão aparecer na parte inferior com a primeira letra maiúscula, um espaço de caráter, seguido por número de ordem, um ponto (um ponto), e espaço (por exemplo, Figura 1. O solo seco ...). Os títulos das tabelas devem aparecer acima dele e antecidos da palavra Tabela (notar a primeira letra maiúscula), um espaço, número de ordem, um ponto e espaço de um personagem (por exemplo, Tabela 1. As concentrações de poluentes ...). Sempre figuras e tabelas têm uma fonte de referência, a palavra "Fonte:" deve aparecer na parte inferior, seguindo pela referência fonte. Tabelas, figuras e textos Fontes sempre terminar com um período (um ponto). As figuras podem ser coloridas, se necessário, no entanto, verificar o tamanho do ficheiro; tamanho ideal de arquivo é de ~ 500 KB para o texto inteiro (2 MB no máximo). Por favor, verifique as propriedades do arquivo, técnicas de uso de imagens redução (resampling) para reduzir o n^o de bits por pixel e / ou n^o de pixels por polegada. Os autores devem explorar todas as possibilidades para reduzir o tamanho da memória do manuscrito e também preservar a qualidade das figuras.

Você pode inserir imagens no artigo, sem aumentar o tamanho do arquivo, basta seguir as dicas abaixo:

arquivos de imagem Utilização em formatos GIF JPG, PNG ou. Esses arquivos geralmente têm padrões de boa qualidade e não consomem muito espaço em disco e memória;

Para inserir as figuras no texto, não use Copiar / Colar (ou Ctrl + C / Ctrl + V);

Salve as imagens em seu computador que você deseja inserir no documento;

Então, vá para a opção de menu disponível para a inserção da imagem de seu editor de texto (por exemplo, em MSWord, selecione Inserir / Imagem / Do arquivo) e localize a imagem que você deseja inserir no documento. Finalmente, insira a imagem selecionada no texto.

Essas dicas vão ser útil para obter o manuscrito enviado com sucesso.

É essencial que as tabelas são formato de texto, não como uma figura ou imagem. Certifique-se que eles podem ser editados. Certifique-se de que as colunas são editados como colunas e não separados por espaço ou tabulação.

Gráficos e figuras originou em MS Excel devem ser inseridas como objetos que podem ser editados. O mesmo para as Equações (Equation editor uso, de preferência usando o MS Word 2010) que devem ser inseridos como objeto, e não como uma imagem e numeradas dentro de (). Figuras devem ter textos legíveis, usando letras maiúsculas / minúsculas como adequados e de alta resolução. Não use títulos no topo. Certifique-se de que eles permitem que edições.

Estrutura de manuscritos Inglês: manuscritos em inglês deve seguir a seguinte seqüência: TÍTULO em Inglês, seguido de um RESUMO (seguido por três palavras-chave que não se replicam as palavras de título ou que aparecem no resumo); Título do manuscrito em Português; Resumo em Português (seguido de palavras-chave em Português); 1. INTRODUÇÃO (incluindo revisão de literatura); 2. MATERIAIS E MÉTODOS; 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO; 4. CONCLUSÕES; 5. AGRADECIMENTOS (se for o caso, mas somente depois que o manuscrito foi aceito para publicação); e 6. Referências (por favor, use referências de revistas com alto impacto, não use processo simpósios, teses e dissertações, a menos que absolutamente essencial e em número limitado).

Veja o "Formulário de Avaliação" (http://www.ambi-agua.net/seer/files/review_form.doc) para verificar o conteúdo esperado de cada seção. Verifique artigos já publicados para ver quais os textos devem estar em negrito e cita apenas artigos pertinentes em revistas científicas.

UNIDADES

Medida Unidades: usar unidades internacionais com um espaço após o número (por exemplo, 10 km h⁻¹, não km / h, verifique o texto para a consistência), exceto% (por exemplo, 10%), ou ° C (por exemplo, 15 ° C).

Verifique todos os caracteres gregos e figuras cuidadosamente.

Solettrar os números de um a nove, exceto quando usado em unidades.

Deixar um único espaço entre as unidades: g L⁻¹, e não GL⁻¹, nem gL⁻¹.

Use o sistema de tempo de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00; 18h30.

Títulos (RESUMO, 1. INTRODUÇÃO, 2. Materiais e Métodos, etc.): Use letras maiúsculas, 14, negrito, alinhado à esquerda.

Legendas: se forem necessárias, serão escritos com letras iniciais maiúsculas, precedido de dois algarismos arábicos, separado e seguido por um ponto, 12, negrito, alinhado à esquerda.

Resumo: deve conter objetivos, metodologia, resultados e conclusões, deve ser composto por uma seqüência de frases em um único parágrafo, com máximo de 250 palavras.

Citations: No texto, as citações devem seguir as recomendações da ABNT-NBR 10520 com as seguintes especificidades:

O sobrenome do autor citado com apenas a primeira letra maiúscula, seguido do ano entre parênteses, quando o autor é parte do texto. Quando o autor não faz parte do texto, entre parênteses, colocar o sobrenome, seguido do ano separado por vírgula. Quando existe mais de um autor, seus sobrenomes são separados por "e". As referências citadas deverão ser preferencialmente de periódicos internacionais de renome publicados nos últimos cinco anos e máximo de 15 referências são esperados.

Equações: Os autores devem expressar as equações da forma mais simples possível. Eles devem apenas incluir apenas as equações necessárias para um leitor médio pode compreender a base técnica do manuscrito. Os manuscritos não devem ter notação matemática excessiva. Os autores devem utilizar o Word Equation Inserir símbolo Microsoft ou equivalente para as equações. As equações devem ser numeradas sequencialmente entre parênteses () e justificada alinhado à direita e eles devem aparecer no texto do manuscrito, logo após ser citado. Não insira equações como "imagens", inseri-los como objeto.

Nota importante para Inglês manuscritos: Os Ambi-Agua incentivos periódicos manuscritos escritos em Inglês, no entanto, esses autores que não têm Inglês como primeira língua, devem ter seus manuscritos revistos por um profissional com bom conhecimento Inglês para revisar o texto (vocabulário, gramática e sintaxe).

Serão aceitas até 15 referências por artigo, de preferência, recentemente publicados na base SciELO (www.scielo.br ou www.scielo.org) ou em revistas internacionais de alto impacto.

Exemplos de como citar referências no texto: Jones (2015), Jones e Smith (2009) ou (Jones, 2015; Jones e Smith, 2009), dependendo da construção da frase. Mais de dois autores: Jones et al. (2014) ou (Jones et al., 2014). Comunicações pessoais ou dados não publicados não devem ser incluídos na lista de referências; bem como Apud (citação indireta) não serão aceitos.

Lista de Referências: Deve seguir ABNT-NBR 6023 recomendações, aqui exemplificados:

Sempre citar a Doi TM no final da referência sempre que possível.

Livros:

Falkner, E. mapeamento aéreo: métodos e aplicações. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 322 p.

Observe que a cidade e editor da publicação são importantes!

Capítulos de Livros:

WEBB, H. Criação de modelos digitais de terreno utilizando fotogrametria analítica e seu uso na engenharia civil. In: Terrain Modelagem em Topografia e Engenharia Civil. New York: McGraw-Hill, 1991. p. 73-84.

As revistas científicas:

MEYER, MP Local de pequeno formato fotografia aérea em levantamentos de recursos. Journal of Forestry, Washington, v. 80, n. 1, p. 15-17, 1982.

Os manuscritos apresentados em eventos (papel impresso) - Estas referências devem ser evitados, mas se essencial:

DAVIDSON, JM; RIZZO, DM; Garbelotto, M .; TJOSVOLD, S .; ABATE, GW Phytophthora ramorum e morte súbita do carvalho na Califórnia: Transmissão II e sobrevivência. In: SIMPÓSIO SOBRE bosques de carvalho: OAKS NA CALIFÓRNIA está mudando paisagem, 5. 23-25 outubro 2001, San Diego, Proceedings ... Berkeley: USDA Forest Service, 2002. p. 741-749.

Os manuscritos apresentados em eventos (eletronicamente) - deve ser evitada, mas se essencial:

COOK, JD; FERDINAND, LD 2001. fidelidade geométrica das imagens Ikonos. In: convenção anual da Sociedade Americana de Fotogrametria e Sensoriamento Remoto, abril 23-27, St. Louis. Proceedings ... St. . Louis: ASPRS, 2001. 1 CD-ROM de Teses e Dissertações - devem ser evitados - em vez preferem os papéis derivados em revistas científicas:

AFFONSO, AG Caracterização de fisionomias Vegetais na Amazônia oriental através de videografia aerotransportada e Imagens LANDSAT 7 ETM +, 2003, 120f. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, de 2003.

Sites na Internet (apenas se for absolutamente essencial):

Estas referências devem ser evitadas, mas se essencial ou seja referente a um jornal publicado eletronicamente:

MUNDO SELVAGEM FUNDO DE VIDA. Ecoregions. 2004. Disponível em: <<http://www.worldwildlife.org/science/ecoregions.cfm>>. Acesso em julho de 2014.

Por favor note que todas as iniciais em nome do autor ter um espaço entre eles.

Apresentação orientações

O arquivo enviado (upload) não deve conter nenhuma identificação dos autores, portanto, sem os nomes dos autores, filiação, nem e-mail. Agradecimentos são importantes, mas eles vão ser editadas para evitar a identificação do autor até que a versão final do artigo para publicação.

As propriedades do ficheiro que identifica o autor deve ser removido. Dicas para fazer isso:

Word 2010:

Abaixo de Arquivo (arquivo), clique em Informação, Verificação de problemas, Inspeccionar documento e nesta janela desmarque Propriedades do Documento e Informações Pessoais, Fechar e Salvar.

Word 2003

Abra as Opções guia, clique em Segurança e eliminar a propriedade do arquivo.

Todo o conteúdo dos artigos são da exclusiva responsabilidade exclusiva dos autores.

Após o envio, o autor correspondente responsável pela inscrição deverá enviar um "Documentos Suplementares" contendo uma carta de apresentação, seguindo o modelo: <http://www.ambi-agua.net/seer/files/cover-letter.doc> ea "submissão LISTA DE VERIFICAÇÃO" cheio seguinte forma: <http://www.ambi-agua.net/seer/files/check-list-en.docx>.

Desde 15 de julho de 2014, a revista começou a cobrar taxas para apresentação e publicação em conformidade com: <http://www.ambi-agua.net/splash-seer/?access=fees>.

Cada edição publicada pela Ambi-Agua apresenta uma imagem representativa de um artigo publicado nessa edição. Autores são convidados a destacar na carta que eles gostariam de ter um valor específico a ser considerado cientificamente interessante e visualmente atraente para estar na capa da revista. As imagens devem ser de alta resolução (300 dpi) e 17 por 17 cm de tamanho. As imagens devem ser originais, e os autores conceder Ambi-Agua a licença para publicar. Carregar a imagem como um arquivo suplementar adicional. Autor deve manter os direitos autorais sobre a imagem apresentada.

Em qualquer caso, os autores conceder Revista Ambiente & Água a licença para usar qualquer imagem do manuscrito publicado para ser usado como a tampa do problema a menos que expressamente indicado o contrário.

Envio de Manuscritos

Antes de começar a apresentar, rever a versão final do manuscrito, o texto da letra de tampa, têm a cópia digital do recibo do pagamento da taxa de apresentação, se não for paga minuciosa PayPal, e log em: <http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/login>. Como autor, iniciar a nova submissão, seguindo as instruções. Lembre-se que você sempre pode mudar a interface de idioma do sistema, no menu à direita. Sua apresentação será completa com o "upload" de quatro arquivos: 1) o texto do manuscrito; 2) Carta de Apresentação; 3) "Lista de verificação de submissão" preenchido; e 4) o recebimento de taxa de pagamento. Esses arquivos devem ser apresentados como "documentos complementares" no sistema periódico. Dúvidas? Escreva para ambi.agua@gmail.com.

<http://www.scielo.br/revistas/ambiagua/iinstruc.htm>

ANEXO 3 - Guide for authors Science The total environment

The total environment is characterized where these five spheres overlap. Studies that focus on at least two or three of these will be given primary consideration. Papers reporting results from only one sphere will not be considered. Field studies are given priority over laboratory studies. The total environment is studied when data are collected and described from these five spheres. By definition total environment studies must be multidisciplinary. **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Please ensure that your manuscript file contains line numbering. Line numbers should be included manually before uploading your files.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Page Limit

There is no restriction on the number of pages but brevity of papers is greatly encouraged. The length of a paper should be commensurate with the scientific information being reported. In particular, the introductory material should be limited to a few paragraphs and results presented in figures should not be repeated in tables.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript

letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Essential title page information

- Title. Be concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Acronyms and brand names of products should not appear in the title of a paper. Instead they may be listed in the key words, and spelled out the first time they appear in the body of the paper.

- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

The mandatory highlights are important because they appear online in the Table of Contents of the journal. Highlights that list bullet points about the results are therefore not very informative for readers scanning the contents. Here is an outline of what the highlights should contain:

What is the overall scientific problem and why did you study it?

How did you address the problem, and which spheres are included?

What was the major method used?

Major finding(s)

Take home message

Do not repeat the highlights in bullet form for the conclusions. The conclusions should be a narrative about what you found and what it means in the broader scheme.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

The key words of the paper should not contain any words already in the title, but can include abbreviated terms or location information not suitable for the title.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case,

indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively with Arabic numerals in accordance with their appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Tables should never be included within the text, because file(s) containing tables are attached separately in the electronic submission system.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template

is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/science-of-the-total-environment>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated in wheat (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Reference to a website:

Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

MethodsX: making your methods reproducible

Authors have the option of converting methods-related supplementary material into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting appropriate credit for this part of their work. MethodsX, which is an Open Access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible.

Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. For more details see www.methodsx.com. The open access fee for MethodsX is US\$520. Please use the following template when preparing your MethodsX article: http://cdn.elsevier.com/promis_misc/MEX_ArticleTemplate.docx