



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PPG  
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS-CECEN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA – DQB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO (MESTRADO) EM RECURSOS AQUÁTICOS E  
PESCA- PPGRAP

**VIVIAN CRISTINA SODRÉ CAMPOS**

**ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DA  
ÁGUA DE TRÊS NASCENTES SITUADAS NA  
ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO MARACANÃ, SÃO LUÍS-MA**

SÃO LUÍS-MA

2018

**VIVIAN CRISTINA SODRÉ CAMPOS**

**ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DA  
ÁGUA DE TRÊS NASCENTES SITUADAS NA  
ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO MARACANÃ, SÃO LUÍS-MA**

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Martins Silva Santos

SÃO LUÍS-MA  
2018

Campos, Vivian Cristina Sodré.

Ensaio ecotoxicológico e biomarcadores na avaliação da água de três nascentes situadas na Área de Proteção Ambiental do Maracanã, São Luís – MA / Vivian Cristina Sodré Campos. – São Luís, 2018.

81 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Débora Martins Silva Santos.

1. Biomarcadores. 2. APA. 3. Ensaio ecotoxicológico. I. Título.

CDU 502.17(812.1)

**VIVIAN CRISTINA SODRÉ CAMPOS**

**ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DA  
ÁGUA DE TRÊS NASCENTES SITUADAS NA  
ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO MARACANÃ, SÃO LUÍS-MA**

Dissertação apresentada em cumprimento  
às exigências do Programa de Pós-  
graduação em Recursos Aquáticos e Pesca  
da Universidade Estadual do Maranhão

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca examinadora**

---

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Débora Martins Silva Santos (Orientadora)

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

---

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin

Universidade Federal de Viçosa (UFV)

1a Examinador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Raimunda Nonata Carvalho Neta

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

2a Examinadora

*A persistência é o menor caminho para o êxito.*

(Charles Chaplin)

*Dedico este trabalho aos meus  
filhos, meu marido, minha família  
e todos que torcem para que meus  
projetos virem conquistas.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, por olhar por mim em todos os momentos e me darem força para alcançar meus objetivos.

Aos meus filhos, por me fazerem sentir realizada em todos os meus projetos e me dar força para conseguir um futuro melhor para eles.

Ao meu esposo, por me apoiar em todos os meus projetos e me ajudar a alcançá-los. Você é meu parceiro de vida, sempre!

À minha mãe, por sempre me ajudar cuidando dos meus filhos para que eu pudesse estudar, pois sem ela seria muito difícil continuar.

Ao meu irmão, meus primos e tios pelo apoio.

À minha orientadora, professora Débora Martins Silva Santos, por acreditar em mim, pela confiança depositada antes e durante o desenvolvimento da pesquisa, pelos ensinamentos e por estar sempre auxiliando no desenvolvimento do trabalho. A senhora foi uma mãe pra mim.

À Elielma, Thays e Tatiana, por me ajudarem durante todo o trabalho, pois sem vocês seria difícil fazer tudo sozinha!

À professora Mariana Basso Jorge, por me ajudar durante a pesquisa cedendo o laboratório e equipamentos e me presenteando com os peixes utilizados. Muito obrigada.

Às minhas colegas de turma que viraram amigas, Bruna, Thércia, Josielma, Lucenilde, Daniele e Alana, pelos momentos bons e ruins vividos.

Aos colegas de turma pelos momentos de terror que superamos.

Aos alunos do terceiro período que ajudaram nas pesquisas.

À Universidade Estadual do Maranhão, pelo Programa de Pós- Graduação (Mestrado) em Recursos Aquáticos e Pesca.

À FAPEMA, pela concessão da bolsa de mestrado.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

As nascentes representam um importante ecossistema aquático que permitem a formação de cursos maiores de água. Devido a isso, as nascentes necessitam ser constantemente monitoradas, fornecendo assim uma avaliação detalhada deste recurso hídrico. Neste contexto, o presente estudo objetivou analisar a qualidade da água de três nascentes situadas na Área de Proteção Ambiental do Maracanã, no município de São Luís (MA), por meio de ensaios ecotoxicológicos crônicos e biomarcadores histológicos e genotóxicos em peixes da espécie *Danio rerio*. Foram analisados parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água e observado o comportamento dos peixes. Após a realização dos ensaios, os peixes foram anestesiados para a retirada de sangue por punção caudal e feito o esfregaço para que fosse realizado o teste do micronúcleo. Posteriormente, os peixes foram fixados em formol, desidratados em série alcoólica crescente, incluídos em parafina, cortados (5µm de espessura) e corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE) para observação das lesões de brânquias em microscopia de luz. Os resultados mostram que as nascentes estudadas estão impactadas, apresentando níveis elevados de coliformes totais tanto no período chuvoso para todos os pontos, como no período seco, na nascente S2. O ensaio ecotoxicológico caracterizou a água das nascentes como não tóxica para os peixes. Entretanto, observaram-se lesões branquiais, mutagênicas e anomalias nucleares nos peixes submetidos aos ensaios com a água das três nascentes durante todo o período de estudo. Desta forma, os resultados demonstram que as nascentes da APA do Maracanã se encontram impactadas, comprometendo os cursos de água formados e prejudicando a sanidade dos organismos que os habitam.



## ABSTRACT

The springs represent an important aquatic ecosystem that allow the formation of larger watercourses. Because of this, the springs need to be constantly monitored thus providing a detailed assessment of this water resource. In this context, the present study aimed to analyze the water quality of three springs located in the Maracanã, Area of Environment of Protection of Maracanã, in the city of São Luís (MA), through chronic ecotoxicological assays and histological and genotoxic biomarkers in *Danio rerio* fish. Physicochemical and microbiological parameters of the water were analyzed and fish behavior was observed. After the tests were performed, the fish were anesthetized for blood withdrawal by caudal puncture and smeared to perform the micronucleus test. Afterwards, the fish were fixed in formaldehyde, dehydrated in an increasing alcoholic series, embedded in paraffin, cut (5µm thick) and stained with Harris haematoxylin and eosin (HE) for observation of gill lesions under light microscopy. The results show that the studied springs are impacted, presenting high levels of total coliforms in the rainy season for all points, as well as in the dry period, at the source S2. The ecotoxicological assay characterized the water from the springs as non-toxic to the fish; however, branchial, mutagenic and nuclear anomalies were observed in the fish submitted to water tests from the three springs throughout the study period. In this way, the results demonstrate that the Area of Environment of Protection of Maracanã springs are impacted, compromising the formed water courses and damaging the sanity of the organisms that inhabit them.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>Figura 1</b> | Mapa da região da APA do Maracanã .....   | <b>37</b> |
| <b>Figura 2</b> | Mapa da região da APA do Maracanã com destaque para os pontos de coleta nas nascentes .....   | <b>38</b> |
| <b>Figura 3</b> | Locais de amostragem na Área de Proteção Ambiental do Maracanã, São Luís-MA (A) S1, (B) S2 e (C).....   | <b>39</b> |
| <b>Figura 4</b> | Biometria da espécie <i>Danio rerio</i> realizada no Laboratório de Ecotoxicologia da UFMA.....   | <b>41</b> |
| <b>Figura 5</b> | Ensaio ecotoxicológico crônico realizado no laboratório de Ecotoxicologia da UFMA.....  | <b>41</b> |
| <b>Figura 6</b> | Imagens (50 $\mu m$ ) dos danos genotóxicos e anomalias nucleares mais observadas. Em A, Micronúcleo (seta); B, brotamento (seta); C, fragmentado (seta) e D, binucleado (seta).....                            | <b>48</b> |
| <b>Figura 7</b> | Fotomicrografia de brânquias. Em A, descolamento do epitélio respiratório (seta). Em B hiperplasia epitelial e fusão parcial de lamelas (setas); C congestão(seta) e D fusão total das lamelas (seta), H.E..... | <b>51</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                 |  |           |
|-----------------|--|-----------|
| <b>Tabela 1</b> | Classificação das alterações histológicas branquiais por Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994) .....                          | <b>43</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Classificação da severidade das lesões por categoria de IAH, segundo Poleksic Mitrovic-Tutundžic (1994) .....                | <b>44</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Valores das variáveis físico-químicas das amostras de água das nascentes situadas nos três pontos da APA do Maracanã.....    | <b>45</b> |
| <b>Tabela 4</b> | Valores microbiológicos das amostras de água dos três pontos das nascentes da APA do Maracanã no período chuvoso e seco..... | <b>46</b> |
| <b>Tabela 5</b> | Valores total, média e desvio padrão dos eritrócitos de com lesões genotóxicas no período chuvoso.....                       | <b>47</b> |
| <b>Tabela 6</b> | Valores total, média e desvio padrão dos eritrócitos de com lesões genotóxicas no período seco.....                          | <b>48</b> |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Gráfico 1</b> | Média e desvio padrão do IAH para brânquias de <i>Danio rerio</i> , durante o período chuvoso..... | <b>49</b> |
| <b>Gráfico 2</b> | Média e desvio padrão do IAH para brânquias de <i>Danio rerio</i> , durante o período chuvoso..... | <b>49</b> |

## LISTA DE SIGLAS

|               |  |
|---------------|--|
| APA           | Área de Proteção Ambiental   |
| CONAMA        | Conselho Nacional de Meio Ambiente                                       |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| DNA/ADN       | Ácido desoxirribonucleico  |
| MN            | Micronúcleos   |
| BR            | Rodovia de responsabilidade do Governo Federal.                          |
| UEMA          | Universidade Estadual do Maranhão  |
| UFMA          | Universidade Federal do Maranhão   |
| CEEA          | Comitê de Ética e Experimentação Animal                                  |
| SEMA          | Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Naturais                          |
| IBAMA         | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| ABNT          | Associação Brasileira de Normas Técnicas                                 |
| pH            | Potencial hidrogeniônico   |
| HE            | Hematoxilina-eosina  |
| IAH           | Índice de Alteração Histológica  |
| OD            | Oxigênio dissolvido  |
| VMP           | Valor mais provável  |
| S1            | Ponto de coleta 1  |
| S2            | Ponto de coleta 2  |
| S3            | Ponto de coleta 3  |
| NMP           | Número mais provável   |
| DP            | Desvio padrão  |

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                | <b>15</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....                                 | <b>19</b> |
| 2.1      | Objetivo Geral.....                                    | 19        |
| 2.2      | Objetivos Específicos.....                             | 19        |
| <b>3</b> | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....                     | <b>20</b> |
| 3.1      | Poluição aquática.....                                 | 20        |
| 3.2      | Nascentes .....  | 22        |
| 3.3      | APA do Maracanã.....                                   | 23        |
| 3.4      | Ensaio ecotoxicológicos.....                           | 25        |
| 3.4.1    | Ensaio crônico.....                                    | 26        |
| 3.4.2    | Escolha do organismo-teste.....                        | 26        |
| 3.5      | Utilização de peixes na toxicidade ambiental.....      | 27        |
| 3.6      | <i>Danio rerio</i> (Zebrafish).....                    | 28        |
| 3.7      | Biomarcadores.....                                     | 29        |
| 3.7.1    | Biomarcadores histológicos em peixes.....              | 31        |
| 3.7.1.1  | Brânquias.....   | 32        |
| 3.7.2    | Biomarcadores genotóxicos.....                         | 32        |
| 3.7.2.1  | Teste do micronúcleo.....                              | 34        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b> .....                               | <b>36</b> |
| 4.1      | Caracterização da área de estudo.....                  | 36        |
| 4.2      | Normas e condutas para o uso dos organismos-teste..... | 38        |
| 4.3      | Coleta e análise da água.....                          | 38        |
| 4.4      | Ensaio ecotoxicológicos.....                           | 39        |
| 4.5      | Teste do micronúcleo (MNs).....                        | 42        |
| 4.6      | Análise histológica.....                               | 42        |
| 4.7      | Análise Estatística.....                               | 44        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b> .....                                | <b>45</b> |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....                                 | <b>52</b> |
| <b>7</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                      | <b>61</b> |
| <b>8</b> | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                               | <b>63</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos oferecem uma vasta fonte de recursos que vão desde a geração de energia elétrica até o fornecimento de alimentos (TUNDISI, 2006). A água doce é indispensável ao ser humano; sua importância vai desde o consumo até atividades industriais e agrícolas, possuindo importância vital para os animais e vegetais (REBOUÇAS; BRAGA; TUNDISI, 2002). Neste contexto, encontram-se inseridas as nascentes de água natural que são utilizadas no abastecimento das comunidades, sendo também importantes na formação de cursos d'água e de bacias hidrográficas (ROCHA, 2009).

As atividades antrópicas têm provocado danos progressivos ao ambiente pela introdução de ampla diversidade de poluentes. O principal receptor destes poluentes é o ecossistema aquático, mesmo que os poluentes sejam lançados no ar ou no solo (BORRELY, 2001). As transformações ambientais decorrentes podem resultar em mudanças na estrutura e na dinâmica de um ecossistema, como modificações no fluxo de energia de um sistema natural (PEREIRA *et al.*, 1997). Além disso, os impactos ambientais que resultam de atividades mineradoras, construção de barragens e represas, retificação e desvio do curso natural de rios, lançamento de efluentes domésticos e industriais na forma *in natura*, desmatamento e uso inadequado do solo, exploração de recursos pesqueiros e introdução de espécies exóticas têm modificado esse ecossistema (GOULART; CALLISTO, 2003).

Recentemente, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos tem aumentado drasticamente como resultado da atividade antropogênica sobre o meio. Este fator contribui para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (SILVA, *et al.*, 2012).

Existem, essencialmente, duas formas pelas quais os poluentes atingem os corpos d'água: por meio de fontes pontuais e de fontes difusas. Nas fontes pontuais chegam ao meio aquático de forma concentrada (descarga de um emissário de esgotos num rio), enquanto nas difusas os poluentes são levados de forma disseminada à bacia de drenagem (MACÊDO, 2003).

Os corpos hídricos refletem sistematicamente todos os impactos das ações e degradações resultantes das atividades antrópicas. Assim, a relevância da identificação dessa unidade como unificadora dos processos ambientais e das interferências humanas leva à sua adoção como unidade de pesquisa, permitindo a avaliação da qualidade e sustentabilidade ambiental a partir da análise de fatores físico-químicos, biológicos e socioeconômicos (FAY, 2006).

Ao julgar pela grande quantidade de efluentes lançados no ambiente aquático por atividades humanas, torna-se economicamente inviável a identificação e estabelecimento de padrões de emissão para todas as substâncias. Além disto, um questionamento como este não avalia os efeitos tóxicos que substâncias podem apresentar à biota e a possível existência do efeito sinérgico entre as substâncias lançadas no ambiente (RAYA-RODRIGUEZ, 2000). Essas alterações no ambiente causam queda acentuada da biodiversidade aquática, atribuídas à desestruturação dos ambientes físico e químico e alterações na dinâmica e na estrutura das comunidades biológicas (CALLISTO *et al.*, 2001).

As ações antrópicas desencadeiam desequilíbrio ambiental, sendo observados efeitos na população que depende direta ou indiretamente desse ecossistema. Alguns animais são capazes de responder de forma rápida a essas modificações no ambiente, constituindo um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental (JESUS; CARVALHO, 2008), como os peixes que são altamente vulneráveis a vários poluentes aquáticos, em especial aqueles que afetam a permeabilidade de água e íons (LUPI *et al.*, 2007). Os peixes apresentam duplo risco de contaminação, que pode ser absorvido de forma direta, através das brânquias ou por meio do alimento ingerido (ODUM, 1988).

As comunidades biológicas reproduzem a integridade ecológica do ecossistema, como por exemplo, a integridade física, química e/ou biológica, integrando os impactos dos diferentes agentes nocivos ao ambiente e proporcionando uma medida agregada dos impactos (BARBOUR *et al.*, 1999). Os grupos de animais aquáticos são representados por organismos que exibem adaptações evolutivas a determinados requisitos ambientais, além de apresentar limites de tolerância a diversas alterações das mesmas (ALBA-TERCEDOR, 1996).

Os efeitos da contaminação em peixes são capazes de se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais que levam ao prejuízo do crescimento e reprodução (ADAMS, *et al.*, 1990). Devido a essas alterações, os órgãos desses animais são muito estudados, e, entre eles, destacam-se as brânquias. Modificações morfológicas nestes órgãos podem ser adotadas como biomarcadores para compostos químicos específicos no monitoramento dos efeitos agudos e crônicos em ambientes aquáticos, poluídos ou contaminados, além de proporcionar índices qualitativos de uma adaptação funcional ao ambiente externo, permitindo avaliar as relações quantitativas entre a estrutura e os processos fisiológicos (LUPI *et al.* 2007).



Os peixes vêm sendo descritos como excelentes modelos biológicos em estudos de biomonitoramento (LIONETTO *et al.*, 2013; FERNANDES, 2005; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Uma vez que o grupo ocupa diferentes níveis tróficos na cadeia alimentar e bioacumula os contaminantes dissolvidos na água, ele pode ser caracterizado como veículo de transferência de contaminantes para as populações humanas por meio da alimentação, além de apresentar um sistema imunológico bem desenvolvido, semelhante ao dos mamíferos, fazendo com que o grupo apresente “respostas” variadas à exposição de xenobióticos. (JESUS; CARVALHO, 2008; SOUZA; FONTANETTI, 2007; LOPES-POLEZA, 2004).

Os biomarcadores em peixes são utilizados como instrumento para diagnóstico de efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos animais. A escolha de órgãos alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos. Órgãos de contato direto com agentes toxicantes e órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais (LINS *et al.*, 2010).

Nesse contexto, estudos de biomarcadores genotóxicos e histológicos em peixes estão sendo usados como indicadores das condições ambientais do ecossistema. As abordagens histológicas em órgãos-alvo, como brânquias e fígados, provaram ser uma alternativa viável para detectar efeitos tóxicos diretos dos compostos químicos durante as etapas orgânicas e metabólicas nos organismos (COSTA *et al.*, 2011; YASSER; NASER, 2011; COSTA *et al.*, 2009; LEONARDI; TARIFEÑO; VERA, 2009; AYAS *et al.*, 2007; CAMARGO; MATINEZ, 2007; AU, 2004; SCHWAIGER *et al.*, 1997). Os biomarcadores genotóxicos, por meio da presença de alterações nucleares juntamente com o teste de micronúcleo, transmitem informações na escala celular, onde “erros” durante as divisões cromossômicas podem ser indicativos de impactos antrópicos (SERIANI *et al.*, 2015; CARROLA *et al.*, 2014; BUCKER *et al.*, 2012; SERIANI *et al.*, 2012; OSSANA *et al.*, 2009).

Considerando que as nascentes representam um importante ecossistema aquático protegido pela Lei Federal nº12.651 de maio de 2012, onde em seu artigo 4º explana que “consideram-se de preservação permanente, pelo efeito da lei, as áreas situadas nas nascentes, ainda que intermitentes e nos chamados olhos d’água, qualquer que seja sua situação topográfica, devendo ter no mínimo um raio de 50 metros de largura” (BRASIL, 2012), torna-se de extrema urgência o monitoramento e avaliação deste recurso hídrico. Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar a qualidade das águas sobre os peixes, por meio de biomarcadores e ensaios ecotoxicológicos realizados em três nascentes situadas na Área de

Proteção Ambiental (APA) do Maracanã, a fim de determinar o grau de risco de toxicidade ambiental a esses ecossistemas, além de fornecer dados que possam subsidiar o projeto de manejo e a recuperação da área em questão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Analisar a qualidade da água de três nascentes situadas na APA do Maracanã, por meio de ensaios ecotoxicológicos e biomarcadores histológicos e genotóxicos em peixes da espécie *Danio rerio*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar análises físico-químicas e microbiológicas da água;
- Realizar ensaios ecotoxicológicos crônicos, utilizando peixes da espécie *Danio rerio* como instrumento para a avaliação do grau de toxicidade da água de três nascentes situadas na APA do Maracanã;
- Comparar os pontos de coleta entre si e com o controle, baseando-se nas alterações observadas durante os testes, para verificação da situação ambiental dos locais de coleta;
- Observar a ocorrência de alterações histológicas branquiais e genotóxicas nos organismos teste após os ensaios ecotoxicológicos; e
- Fornecer dados que possam colaborar com os projetos de manejo e recuperação implantados na área em questão.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Poluição aquática

Os sistemas aquáticos são de fundamental importância para os organismos, uma vez que todos dependem de água para sobreviver (MORAES, 2013). Além disso, inúmeras atividades são desenvolvidas nestes ambientes, tais como a geração de energia, abastecimento das cidades, o transporte fluvial e marítimo, obtenção de alimentos e irrigação (MORAES, JORDÃO, 2002).

De acordo com alguns especialistas, a crise da água no século XXI está relacionada muito mais com o gerenciamento que se faz desse bem do que uma crise real de escassez (ROGERS *et al.*, 2006). Desta forma, a gestão dos recursos hídricos no Brasil vem sendo discutida de forma diferente, uma vez que a discussão girava em torno dos elementos relacionados à produção de energia do país, particularmente ao armazenamento e à contenção de cheias por meio de barragens (BRASIL, 2003). Entretanto, atualmente, devido à degradação qualitativa e quantitativa, a preocupação também está sendo muito mais relacionada ao controle de resíduos industriais e domésticos que são lançados “*in natura*” nos cursos d’água (BRASIL, 2002).

Para outros especialistas, a crise da água é resultado de um conjunto de problemas ambientais agravados com outros problemas relacionados à economia e ao desenvolvimento social (GLEICK, 2000), resultando em modificações nas opiniões de comunidade científica e comissões regulatórias que vêm tomando consciência sobre os impactos ambientais sobre a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas.

Impacto ambiental pode ser definido como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente resultante de atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais (CONAMA, 2005).

Tundisi *et al.* (2006) relataram que, no amplo contexto social, econômico e ambiental do século XXI, os seguintes agravantes são as causas principais da intitulada por ele “crise da água”.

- Intensa urbanização, o que aumenta a demanda pela água, ampliando desta forma a descarga de efluentes nos recursos hídricos contaminando-os;

- Estresse e escassez de água em muitas regiões do planeta em razão das alterações na disponibilidade e aumento de demanda;
- Infraestrutura pobre e em estado crítico, em muitas áreas urbanas com até 30% de perdas na rede após o tratamento das águas;
- Problemas de estresse e escassez em razão de mudanças globais com eventos hidrológicos extremos aumentando a vulnerabilidade da população humana e comprometendo a segurança alimentar (chuvas intensas e períodos intensos de seca);
- Problemas na falta de articulação e falta de ações consistentes na governabilidade de recursos hídricos e na sustentabilidade ambiental.

Segundo Coelho (2006), embora os ecossistemas aquáticos apresentem mecanismos físicos, químicos e biológicos para assimilar certas substâncias tóxicas, à medida que estas atingem níveis acima da capacidade assimilativa do meio receptor, afetam a sobrevivência, o crescimento e a reprodução dos organismos que ali vivem.

Deste modo, a má qualidade da água traz prejuízos ao crescimento, reprodução, sanidade, sobrevivência e qualidade do pescado, o que acaba comprometendo o sucesso dos sistemas aquícolas. Isso ocorre devido a uma série de mudanças que podem induzir alterações que comprometem a homeostase ou causam enfermidades com alta taxa de mortalidade. Além disso, o estresse torna o peixe susceptível às mais variadas enfermidades, particularmente as infecciosas e parasitárias (WALTERS; PLUMB, 1980). Técnicas de avaliação do impacto ambiental que demonstraram ocorrer alterações estruturais em populações de peixes de áreas vizinhas a grandes densidades demográficas onde há elevado grau de contaminação por sedimentos são relatados por Malins (1989).

Ambientes de água doce são os principais receptores aquáticos da maioria das substâncias tóxicas produzidas e liberadas por atividades industriais, domésticas e agrícolas (MASSARO, 2006). O quadro se agrava, pois esses possuem características abióticas e ecológicas que colaboram para a disseminação de contaminantes e poluentes em todo seu regime hídrico (GOULART, CALLISTO, 2003). Os poluentes podem gerar efeitos deletérios tanto para os seres humanos, quanto para toda biota aquática (MCGLASHAN; HUGHIES, 2001).

A degradação soma-se ao desmatamento em áreas de nascentes e matas ciliares, uso inadequado do solo e captação inadequada nos recursos hídricos que repercutem na vida aquática, exigindo urgentemente o gerenciamento a fim de garantir a sustentabilidade. Todos

esses fatores induzem à degradação da qualidade da água, à perda de diversidade biológica e ao desperdício de recursos hídricos (STRAŠKRABA; TUNDISI, 2008).

Esses processos desencadeiam a eutrofização dos corpos hídricos, consistindo no enriquecimento com nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, que entram como solutos e se transformam em partículas orgânicas e inorgânicas. Em decorrência disso, ocorre maior abundância de plantas aquáticas e o crescimento de grandes volumes de algas, potencialmente tóxicas, tornando-se um risco à saúde do ecossistema. Esse aporte de nutrientes pode inferir também na composição, virulência e sobrevivência de agentes patogênicos residentes, além de implicar em aumento no custo do tratamento da água para abastecimento (GALLI; ABE, 2010).

Essas áreas muito importantes para manter o abastecimento de água de boa qualidade. Em contrapartida, as práticas que se seguem após a retirada das árvores tendem a produzir intensa e prolongada degradação da qualidade da água (BROWN, 1988). Segundo o Código Florestal, em nascentes (mesmo intermitentes) e olhos d'água, a distância a ser preservada com mata é de 50 m (BRASIL, 1965), no entanto, não é o que normalmente se observa.

Entretanto, as ações de preservação são essenciais, uma vez que os recursos hídricos do Brasil apresentam grande significado ecológico, econômico e social, refletido na economia, na área social e nos usos dos sistemas aquáticos. Contudo, esse gerenciamento depende de uma forte base de dados e de desenvolvimento de mecanismos de transferência do conhecimento científico básico para a aplicação. Como há grandes diferenças geomorfológicas, ecológicas e antropológicas nas várias latitudes no Brasil, essa atuação torna-se mais intrincada, pois depende de uma base local ou regional de dados e informações científicas compatíveis, com os sistemas regionais (REBOUÇAS *et al.*, 2006).

### **3.2 Nascentes**

Os conceitos de nascente contidos na literatura a caracterizam de forma genérica sem englobar toda a sua complexidade. Os produtos cartográficos são as formas tradicionais utilizadas para mapear e caracterizar nascentes, os quais identificam as nascentes pelo começo dos rios, pela variabilidade sazonal de vazões, forma de ocorrência e características da feição hidrogeológica (FARIA, 1997).

Sendo assim, a nascente, conhecida popularmente como olho d'água, é definida como o local onde aflora naturalmente, mesmo que de forma intermitente, a água subterrânea e a dimensão mínima da faixa marginal de vegetação nativa a ser preservada nas nascentes são de 50 m de raio, segundo o Código Florestal (Lei nº 4.771/65) (BRASIL, 1965) em seu artigo segundo e, a Resolução CONAMA 303/2002, artigo 3º, inciso III (BRASIL, 2002).

Esta proteção está reafirmada na Lei nº 9.433/97 (BRASIL, 1997) que instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos que está fundamentada no fato de que a água, embora reconhecida como um recurso natural renovável seja também um recurso de domínio público.

Oliveira-Filho *et al.* (2005) destacaram que a devastação das matas ciliares tem contribuído para o assoreamento, o aumento da turbidez das águas, o desequilíbrio do regime das cheias, a erosão das margens de grande número de cursos d'água, além do comprometimento da fauna silvestre. Arcova e Cicco (1997) enfatizaram que nas microbacias de uso agrícola o transporte de sedimentos e a perda de nutrientes são maiores quando comparadas às de uso florestal.

Os níveis de qualidade das águas naturais estão dispostos na Resolução nº 357 do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2002), determinando os parâmetros de classificação que estabelece que para água doce utilizada para abastecimento sem pré-desinfecção ou com desinfecção simplificada, não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes totais por 100 mL. Para consumo sem desinfecção, o Ministério da Saúde estabelece na Resolução 2914 de 12/12/2011, que não deve conter nenhum coliforme total em 100ml de água.

Para auxiliar na conservação das nascentes, foram criadas as Áreas de Proteção Ambiental (APAS), por meio de decreto, auxiliando na proteção dos recursos hídricos, a fim de controlar o crescimento urbano, bem como a exploração do recurso.

### **3.3 APA do Maracanã**

As Áreas de Proteção Ambiental (APA) enquadradas como Unidade de Conservação de Uso Sustentável, são definidas pelo artigo 15 da Lei Federal nº 9.985, de 18 de julho de 2000, como.

[...] uma área em geral extensa, com certo grau de ocupação humana, dotada de atributos abióticos, bióticos, estéticos ou culturais especialmente importantes para a qualidade de vida e o bem-estar das populações humanas, e tem como objetivos básicos proteger a diversidade biológica, disciplinar o processo de ocupação e assegurar a sustentabilidade do uso dos recursos naturais" (BRASIL, 2000).

Segundo Silva (2006) o objetivo principal da APA é a proteção dos recursos naturais associada ao desenvolvimento de atividades produtivas, tendo em vista a melhoria da qualidade de vida da população local.

De acordo com Farias Filho (2010), “a APA do Maracanã [...] engloba as localidades do Maracanã, Ferventa, Alto Alegre, parte da Vila Maranhão, Vila Sarney, Vila Esperança e Rio Grande, a Vila Industrial e Vila Primavera”. Esta unidade de conservação foi criada por meio do Decreto Estadual 12.103 de outubro de 1991, do Governo do Maranhão, devido à necessidade de proteger este local da constante ação degradante do homem para com o meio ambiente, na medida em que está situada próxima ao Distrito Industrial do Maranhão, da ALUMAR (Consórcio e Alumínio do Maranhão) e do Aterro Sanitário da Ribeira.

Na APA, fica localizado o bairro do Maracanã que está distante 25 quilômetros do centro de São Luís. Possui uma área de 1.831 hectares e está situada próxima ao mar, é cortada por dois rios o rio Grande e o rio Maracanã (SANTOS; SANTOS 2009). A preservação deste ecossistema é muitas vezes falha o que acaba por prejudicar diversas espécies de organismos que dependem dele, assim como a qualidade de suas águas.

Carvalho Neta e Farias-Filho (2010) descreveram a fauna da APA, que basicamente estava composta por mamíferos de pequeno porte comuns a região amazônica (roedores em sua maioria), aves de pequeno e médio porte como beija-flores (*Colibri delphinae*), jaçanãs (*Jacana jaçanã*), urubus-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*), entre outros, além de répteis como jacarés (*Alligatoridae*), lagartos de pequeno porte (*Gekkonidae* e *Tropiduridae*), serpentes como cascavel (*Crotalus* e *Sistrurus*), jiboia (*Boa sucure* Euneptes) e caninana (*Spilotes*), anfíbios, rãs e sapos (*Bufo* *idae*, *Leptodactylidae*, *Hylidae* e *Ranidae*) e peixes de água doce: cará (*Cichlasoma psittacus*, *Geophagus brasiliensis*); jeju (*Erythrinus unitaeniatus*); piabas (*Astyanax bimaculatus*, *Holoshstes heterodon*, *Cheirodon piaba*); peixe-sabão ou lalau (*Rypticus* sp); tambaqui (*Colossoma macropomum*); tilápia (*Oreochromis niloticus*); traíra (*Hoplias malabaricus*); muçum (*Synbranchus marmoratus*) e sarapó (*Gymnotus carapo*, *Apteronotus brasiliensis*).

Ainda que seja uma área legalmente protegida, existem várias atividades que são desenvolvidas no local, tais como a extração de madeira, a mineração, a captura de animais, a realização de queimadas e a criação extensiva de búfalos, que contrariam os vários pressupostos de conservação estabelecidos para uma área legalmente protegida (OLIVEIRA; FARIAS-FILHO, 2011), que levam segundo Oliveira e Herrmann (2005), “à perda de sua



memória e à degradação *lato sensu*”, pois geram diversos prejuízos aos ecossistemas locais e à qualidade de vida das pessoas que moram na área.

Neste contexto, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de preservar ou recuperar nascentes (CALHEIROS, *et al.* 2004; GOMES *et al.*, 2005; MACEDO, 2005; DONADIO *et al.*, 2005; MORMUL *et al.*, 2006; FELIPPE; MAGALHÃES, 2012), pois apesar de protegidas pela legislação, ainda sofrem com ações antrópicas.

### **3.4 Ensaios ecotoxicológicos**

Entende-se por testes de toxicidade, os ensaios laboratoriais que são executados sob circunstâncias experimentais específicas e controladas, aplicadas para avaliar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (RIBO, 1997). Nestes ensaios, os animais, chamados organismos-testes são submetidos à exposição de diferentes tipos de amostras, que podem ser diferentes concentrações, e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (HILL *et al.*, 2005).

Estes testes são excelentes métodos para analisar a qualidade da água e a carga poluidora de efluentes, pois somente as análises físico-químicas realizadas de maneira tradicional, seriam incapazes de prever os efeitos dos constituintes químicos sobre os sistemas biológicos, sendo insuficientes para determinar o potencial de risco ambiental dos contaminantes (RONCO *et al.*, 2004).

Os testes são realizados com organismos que, devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas, apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes. A exposição pode ser aguda, quando o agente tóxico é liberado em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periódicos durante um longo período de tempo (SCHVARTSMAN, 1991).

Entretanto, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais, uma vez que as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas e os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Desta forma, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam.

### *3.4.1 Ensaio crônico*

Os testes crônicos permitem avaliar os possíveis efeitos adversos de uma amostra sob condições de longo tempo de exposição a concentrações subletais (RAND, 1995). Em outras palavras, avalia a ação dos poluentes cujo efeito traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por um longo tempo (RAND; PETROCELLI, 1985). No teste de ecotoxicidade crônico, os organismos-teste são observados e os efeitos crônicos podem ser evidentes imediatamente após a exposição (DUFFUS, 1993). RAND; PETROCELLI, 1985).

De acordo com Chasin e Azevedo (2003), a intoxicação crônica pode ocorrer de duas maneiras:

- Pela acumulação do xenobiótico no organismo que ocorre quando a quantidade do xenobiótico eliminada é inferior a absorvida, assim, a concentração deste aumenta progressivamente até a obtenção de níveis suficientes para causar danos.
- Pela adição dos efeitos causados por exposições repetidas, sem que o agente tóxico se acumule no organismo.

No ambiente aquático, a ocorrência de efeitos crônicos é mais frequente, devido à diluição pontual dos xenobióticos oriundos das águas de contribuição, às relações antagonistas entre as substâncias, à rápida associação das partículas, à matéria húmica e a sedimentação de sólidos em suspensão. Sendo assim, os organismos ficam susceptíveis a baixas concentrações por um longo período de tempo ocasionando efeitos crônicos letais ou subletais ao longo do tempo (STEPHAN; MOUNT. 1973).

### *3.4.2 Escolha do organismo teste*

Muitas espécies vêm sendo empregadas para a utilização em testes de toxicidade, porém alguns organismos ganham destaque quando o assunto é sensibilidade a agentes tóxicos, como microalgas, microcrustáceos, equinoides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

De acordo com Rand e Petrocelli (1985), para escolher o organismo são levados em consideração os seguintes critérios:

- Abundância;
- Biodisponibilidade;

- Expressão ecológica significativa dentro da biocenose;
- Cosmopotismo da espécie;
- Conhecimento de sua biologia fisiologia e hábitos alimentares;
- Estabilidade genética de sua população;
- Baixo índice de sazonalidade;
- Sensibilidade constante e apurada;
- Importância comercial;
- Facilidade de cultivo em laboratório;
- E se possível, ser espécie nativa.

Segundo Klontz (1972), peixes são diretamente relacionados com o ambiente aquoso, e as modificações físicas e químicas do ecossistema são refletidas de maneira muito rápida como medidas fisiológicas quantificáveis nos peixes.

### **3.5 Utilização de peixes em estudos de toxicidade ambiental**

Os animais aquáticos estão expostos constantemente a um enorme número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente. A fonte dessa contaminação é diversa, que vai desde efluentes industriais, processos de drenagem agrícola (fertilizantes, agrotóxicos), derrames acidentais e não acidentais de lixos químicos (metais pesados, compostos orgânicos e inorgânicos) a lixos domiciliares que acabam por chegar a rios e mares, ocasionando a destruição dos ecossistemas aquáticos (RASHED, 2001).

Os peixes são susceptíveis a um perigo duplo de contaminação por poluentes, uma vez que podem ser contaminados através de absorção direta de substâncias do meio pelas brânquias ou pelo alimento ingerido (ODUM, 1988). Assim, são organismos com capacidade de bioacumulação, biotransformação, compensação morfofisiológica, de regular a forma neuroimunoendócrina e servem como modelo preditivo de mutação e teratogênese (KLAASSEN, 2001; DE AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Considerado um grupo de extrema importância nas avaliações de toxicidade ambiental, muitos são utilizados para esse fim devido às características essenciais, pois além de estarem presentes em vários ambientes e apresentarem ampla distribuição geográfica, participam ainda de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo considerados excelentes modelos biológicos de estudo (JESUS; CARVALHO, 2008). Além disso, os peixes são muito utilizados nos estudos de impactos ambientais por possuir metodologia bem

definida e de fácil desenvolvimento, gerarem respostas em curto prazo, serem de baixo custo para análises e serem altamente sensíveis (FREIRE, 2008).

Os organismos que pertencem ao topo da cadeia alimentar comumente são empregados como bioindicadores por possuírem uma relação intrínseca com o resto da cadeia inferior, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia, além de efeitos diretos no nível do indivíduo (LINS *et al.*, 2010). Nos animais bioindicadores são observados diversos parâmetros para mensurar a qualidade ambiental, sendo eles bioquímicos, celulares, fisiológicos ou genotóxicos, denominados biomarcadores do bioindicador, pois essas variáveis irão refletir alterações provenientes da interação entre o poluente e o bioindicador (MCCARTY *et al.*, 1996).

A importância dos indicadores na gestão ambiental e, especificamente no processo de administração da água é retratada na problemática da carência de dados em quantidade e qualidade adequadas, incluindo a linguagem acessível, comprometendo a operacionalização das bases da reforma na gestão da água no país. Nesse sentido os indicadores são instrumentos de auxílio ao processo decisório na gestão da água, facilitando a comunicação e a compreensão da realidade (MAGALHÃES JÚNIOR, 2007).

Tundisi (2005) ressalta a importância da biota aquática no equilíbrio do funcionamento dos ecossistemas aquáticos, pois exercem papel relevante na manutenção dos ciclos biogeoquímicos, na constante reprodução da biomassa viável que interage permanentemente com os vários componentes do sistema.

### **3.6 *Danio rerio* (Zebrafish)**

O zebrafish (*Danio rerio*), conhecido popularmente como paulistinha, é um pequeno teleosteo de água doce da família Cyprinidae, amplamente utilizado como um vertebrado modelo de estudos de desenvolvimento, neurobiológicos, toxicológicos e farmacológicos (RUBINSTEIN, 2003, GUO, 2004, HILL *et al.*, 2005).

Trata-se de uma espécie gregária e normalmente encontra-se em cardumes de 5 a 20 indivíduos de ambos os sexos, comportamento esse inato e hereditário. Porém, embora possuam comportamento social, podem apresentar-se agonista, especialmente durante o estabelecimento de hierarquias de dominância, que ocorrem dentro de cada sexo e entre eles (LAWRENCE, 2007).

Possuem dimorfismo sexual, onde os machos são alongados, delgados e levemente dourados, especialmente no abdômen e nas nadadeiras peitoral e caudal, e apresentam lista abdominal completa. Já as fêmeas são robustas, ligeiramente maiores que os machos e prateadas, geralmente apresentam o abdome inchado devido ao desenvolvimento dos ovos e a lista abdominal é incompleta (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Alimentam-se de uma ampla variedade de zooplâncton e insetos e, em menor proporção, de algas, detritos e outros materiais orgânicos. Possuem hábitos tipicamente diurnos, mostrando os maiores níveis de atividade durante as primeiras horas da manhã. Descansam frequentemente, embora não exclusivamente, durante a noite. Esse padrão de atividade influi nos processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais no animal, padrão esse que deve ser levado em consideração nos biotérios de criação (CONCEA, 2008).

No peixe da espécie *Danio rerio*, o manejo, a facilidade de reprodução e de manutenção, e os métodos laboratoriais para sua criação já estão bem estabelecidos (WESTERFIELD, 1994). Além disto, os peixes podem ser mantidos em grupos relativamente grandes por aquário; porém sua manutenção requer alguns cuidados básicos e a compra de equipamentos específicos. Entretanto, estes são de baixo custo quando comparados aos equipamentos exigidos por animais experimentais mais tradicionais, como roedores. Possuem alta taxa de fecundidade e rápida maturação sexual, entre três e seis meses (HILL, *et al.*, 2005).

O *Danio rerio* possui grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos, por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e por acumulá-las em diferentes tecidos, principalmente no sistema nervoso central (GROSEL; WOOD, 2002). Essas alterações nos órgãos e tecidos são denominadas de biomarcadores de contaminação ambiental (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

### **3.7 Biomarcadores**

As análises físico-químicas são vantajosas por expressarem seus resultados de forma específica e quantitativa. Porém, as concentrações dos elementos químicos mensurados no solo, na água ou no ar, não representam um “valor” biológico, ou seja, não sugerem quais são as implicações na biota (OLIVEIRA, 2000).

As modificações em nível celular, tecidual ou sistêmico são indicativas de danos que os contaminantes podem provocar nos peixes (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Essas alterações

são denominadas de biomarcadores, sendo muito utilizadas para o monitoramento ambiental, pois permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos e possibilitam mensurar os efeitos subletais (JESUS; CARVALHO, 2008).

Em outras palavras, os biomarcadores são respostas funcionais de exposição a fatores de estresse manifestados em nível molecular, fisiológico ou comportamental, que geram alterações moleculares, celulares, genéticas, imunológicas e fisiológicas (JESUS; CARVALHO, 2008). O uso dos biomarcadores é de fundamental importância na avaliação dos danos ocasionados pela exposição a xenobióticos. A utilização do termo biomarcador está diretamente ligada aos parâmetros bioquímicos, fisiológicos ou histológicos, os quais atuam no organismo ou em partes dele (BERNET *et al.*, 1999). Há biomarcadores moleculares, celulares e em nível de indivíduo (LIVINGSTONE, 1993; CARVALHO-NETA *et al.* 2012; CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2013). Porém, as duas características mais importantes relacionados a todos eles são:

- Permite observar as relações que acontecem entre poluentes e os organismos;
- Proporciona a determinação de resultados subletais.

Além disso, sua avaliação antecipa mudanças nos altos níveis de organização biológica, uma vez que pode ser detectada antes da morte do indivíduo, e assim, permite observar os efeitos antes que se manifestem em níveis de população e comunidade (MONSERRAT *et al.*, 2003).

De acordo com Rüdiger (1999), a classificação dos biomarcadores depende de sua finalidade e aplicação, podendo ser classificado em 3 tipos:

- Biomarcadores de exposição, que podem ser utilizados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, a uma determinada substância, estabelecendo um elo entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna.

- Biomarcadores de efeito, que podem ser utilizados para evidenciar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde derivados da exposição e absorção de tal substância química. Assim, a comunicação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta.

- Biomarcadores de suscetibilidade, que permitem esclarecer o nível de resposta da exposição ocasionada nos indivíduos.

Existem vários tipos de biomarcadores, tais como bioquímicos, histológicos, genotóxicos, hematológicos, entre outros, uma vez que essas alterações bioquímicas, fisiológicas, celulares ou teciduais em resposta a poluentes ambientais, podem ser

mensuradas, indicando a presença, o efeito, e por vezes, o grau de contaminação (WALKER, 1996).

Alterações branquiais são muito utilizadas em estudos de avaliação da qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos, tanto em ambientes naturais (NOGUEIRA *et al.*, 2008; SANTOS-FILHO *et al.*, 2014) quanto em ensaios toxicológicos (BRESEGHELO *et al.*, 2004). Esses biomarcadores vêm sendo utilizados em peixes no Maranhão para avaliar a qualidade da água de ambientes naturais e de pisciculturas (CARVALHO-NETA *et al.*, 2012; PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014).

### 3.7.1 Biomarcadores histológicos em peixes

São muito sensíveis a mudanças ambientais (LUPI *et al.*, 2007), e os resultados da interação com os poluentes são capazes de serem evidenciados em células e tecidos, antes de serem identificadas mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa (VAN DYK, 2005). Devido a isso, os efeitos iniciais na biologia dos peixes têm sido muito utilizados em função do estresse provocado pelos poluentes para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e têm sido sugeridos como biomarcadores em várias espécies (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Diversos organismos da biota aquática podem ser utilizados como indicadores das alterações que os habitats vêm sofrendo. Entre os táxons mais utilizados, os peixes destacam-se como bons bioindicadores, uma vez que podem vir a assimilar, absorver, acumular e transferir compostos dissolvidos no ambiente (MINISSI *et al.* 1996; PORTO *et al.* 2005; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

As alterações histológicas em tecidos de peixes representam instrumentos significativos para verificar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo, logo, são fortes indicadores de exposição prévia a estressores ambientais (HINTON *et al.*, 1992; SCHWAIGER *et al.*, 1997; GAGNON; BAKHTYAR 2013; SOUSA *et al.* 2013). Também possibilitam que se façam previsões sobre prováveis condições de higidez dos peixes submetidos a grandes modificações ambientais, com custo baixo e proporcionando o alcance de respostas em períodos de tempo relativamente curtos. Essas alterações também refletem a lesão causada em função da duração e da intensidade da exposição ao elemento poluente, bem como a capacidade de adaptação do tecido a este agente (JOHNSON *et al.*, 1993).

Desta forma, as características zoológicas e fisiológicas possibilitam a esses peixes a sobrevivência nas mais variadas condições ambientais dos diferentes habitats, sendo considerados bons indicadores do ambiente em que vivem, sobretudo, no que diz respeito a efeitos persistentes e acumulativos ao longo da cadeia alimentar (MIRANDA, 2006).

#### 3.7.1.1 Brânquias

A maioria dos peixes realiza trocas gasosas por meio de brânquias localizadas na cavidade opercular. São divididas em arcos dos quais partem filamentos branquiais nos quais são inseridas duas fileiras de lamelas secundárias, ocorrendo na maioria dos teleósteos (FERGUSSON 1989). São órgãos extremamente importantes nos peixes, pois exercem várias funções vitais; além disso, estão envolvidas nos processos de osmorregulação equilíbrio acidobásico e excreção de compostos nitrogenados (WILSON *et al.*, 2002).

Elas atuam como interface seletiva entre os ambientes interno e externo e possuem células de muco que desempenham importante papel na proteção do epitélio a substâncias tóxicas e patogênicas (BERNET *et al.*, 1999), uma vez que os agentes agressores que estão dissolvidos na água e que entram em contato com os filamentos branquiais e com as lamelas em altas concentrações podem alterar a morfologia normal das brânquias (LUVIZOTO, 1994). Sendo caracterizadas como um bom órgão para observação da toxicidade aquática (BARRETO, 2007). Isso pode ocorrer devido ao epitélio branquial possuir importante papel na manutenção osmótica e iônica dos peixes, e as células que o constituem respondem de forma direta ou indireta aos fatores ambientais e a alterações internas do organismo (LUPI *et al.*, 2007).

#### 3.7.2 Biomarcadores genotóxicos

Os agentes genotóxicos se relacionam quimicamente com o material genético, ocasionando modificações no DNA, onde na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio sistema de reparo da célula ou a mesma é eliminada. Entretanto, caso a lesão seja fixada, provocando mutações, perpetuando nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é considerado mutagênico (MÍDIO; MARTINS, 2000).



Em geral, os biomarcadores de danos no DNA são ferramentas valiosas para observar os efeitos da exposição aguda e crônica de organismos aquáticos a substâncias genotóxicas. Além disso, como as genotoxinas podem induzir mudanças no DNA que são transmitidas às futuras gerações, esse tipo de biomarcador pode ser usado para evitar consequências ecológicas irreversíveis (MONSERRAT *et al.*, 2007).

Ainda que as mutações possam surgir de maneira espontânea, geralmente são provocadas por agentes físicos, químicos ou biológicos (MATSUMOTO, 2004). Neste sentido, a utilização desses parâmetros, como método de averiguação da qualidade hídrica, possibilita avaliar a consequência dos poluentes no meio, além de observar as modificações de seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o ambiente (JESUS; CARVALHO, 2008).

Os xenobiontes\* também trazem danos no DNA, modificando a estabilidade genética. Este processo é capaz de representar os passos iniciais para o processo carcinogênico além da diminuição da viabilidade e fertilidade de gametas (RIBEIRO, 2003), sendo considerada uma ótima ferramenta de observação do nível de contaminação.

Em nível celular são utilizados pelo menos dois tipos de biomarcadores genotóxicos como indicativos de dano ao material genético: o teste do micronúcleo e o ensaio cometa (JESUS; CARVALHO, 2008).

No teste do micronúcleo são observadas alterações mutagênicas, ou seja, que não há reversão, uma vez que são modificações que ocorrem durante a divisão celular, sendo transmitidas às células-filhas, e anomalias nucleares, que também constituem um indicativo de genotoxicidade (VICARI, 2009).

Outra técnica muito utilizada para detecção de genotoxicidade é o ensaio do cometa (KAMMANN *et al.*, 2001; KAMER; RINKEVICH, 2002; AKCHA *et al.*, 2003). Esta técnica não é utilizada para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas com o teste do cometa são passíveis de correção (GONTIJO; TICE, 2003), constituindo, portanto, lesões pré-mutagênicas. Por ser considerado sensível, rápido e econômico, o ensaio cometa tem sido indicado como um método capaz de detectar mudanças na estrutura do DNA (KAMMANN *et al.*, 2001).

### 3.7.2.1 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é uma das metodologias mais utilizadas na atualidade para observar e avaliar anormalidades ocasionadas por substâncias xenobióticas\*\* nos organismos. Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (SCHIMID, 1975). OHE *et al.* (2004) fizeram uma análise de 128 publicações em uma revisão incluindo dados de bioensaio mutagênico/genotóxico e concluíram que os tipos de danos mais avaliados pela genotoxicidade em espécies geralmente marinhas, são mutações no nível cromossômico (teste de micronúcleo), DNAaductos (32P-pós-marcação) e quebras de cadeia de DNA (ensaio cometa).

Esse tipo de teste tem sido muito indicado para estudos de biomonitoramento ambiental, essencialmente por sua habilidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal). Entretanto exige a proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito (FENECH, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003).

De acordo com Walker *et al.*, 1996).

O micronúcleo (MN) é uma pequena massa nuclear delimitada por uma membrana independente do núcleo principal que aparece nas células filhas como consequência de danos, não reparados, ocorridos nas células -mães.

O teste em peixes foi proposto por Heddle (1973) e Schimid (1975) como uma avaliação do dano no DNA por meio da quantificação e análise dos corpúsculos de Howell-Joly. Durante as análises de micronúcleos, alguns pesquisadores observaram a existência de outras anormalidades nucleares, sugerindo que estas devam ser reportadas em seus resultados (FENECH *et al.*, 1999). Essas lesões ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Entretanto, Carrasco, Tylbury e Myers (1990) descreveram e fotografaram alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes. Tais lesões foram classificadas em.

---

\***Xenobiontes:** (do grego, *xenos* =estranho) são compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico. Pode ser encontrado num organismo mas não é normalmente produzido ou esperado existir nesse organismo. O termo é também aplicado a substâncias presentes em concentrações muito mais elevadas que o nível normal. Em específico, medicamentos tais como antibióticos são xenobióticos em humanos porque o corpo humano não os produz nem fazem parte da dieta humana. .

\*\***Xenobióticos:** Compostos sintetizados quimicamente, isto é, não ocorrem naturalmente. Os xenobióticos compreendem uma longa lista de compostos, a qual inclui pesticidas, bifenóis policlorados (PCBs, utilizados em transformadores elétricos e em indústrias geradoras de energia), munições, corantes e solventes clorados.

- **Blebbled (Segmentado):** núcleos com pequena evaginação da membrana nuclear, o que parece conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O diâmetro destas evaginações pode variar desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- **Lobed (Lobulado):** núcleos com evaginações maiores que as descritas para os blebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- **Vacuolated (Binucleado):** núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- **Notched:** núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

Segundo Fenech (2000) essas anormalidades relacionam-se aos erros que ocorrem durante a mitose ou meiose, com os processos de morte celular (necrose e apoptose), além da própria mutagenicidade.

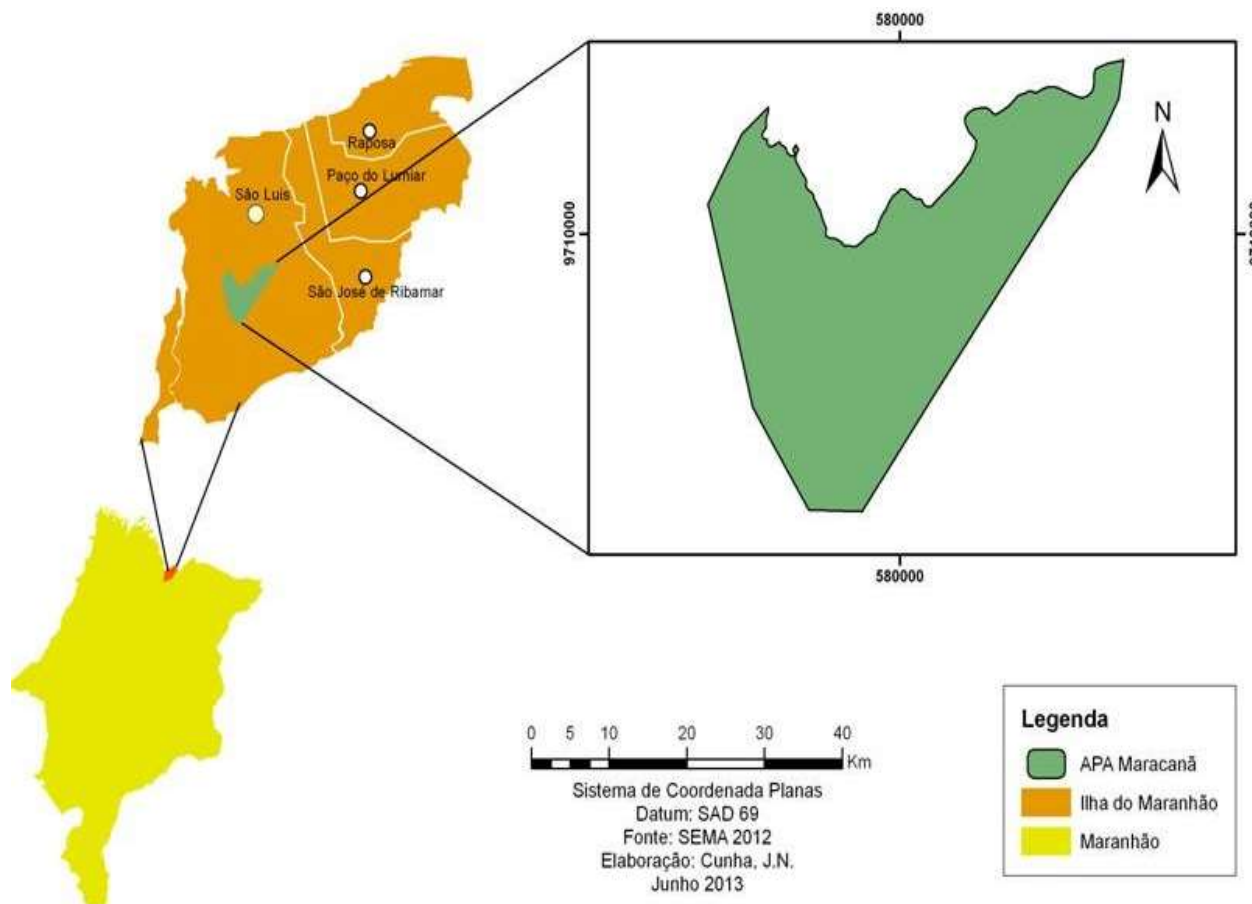
## 4 METODOLOGIA

### *4.1 Caracterização da área de estudo*

De acordo com o DECRETO 12.103 de OUTUBRO de 1991, a APA do Maracanã foi criada em 1991 com o objetivo de manter os recursos hídricos da região preservados, uma vez que 2% do abastecimento da ilha de São Luís vêm desses mananciais situados na APA, pois os mesmos deságuam no reservatório do Batatã (Brasil, 1991). Atualmente, essa unidade de conservação tem funcionado como zona de amortecimento de impactos do Parque Estadual do Bacanga (DIAS, 2012), sendo os principais corpos hídricos os rios Maracanã, Ambude, Bacanguinha e Batatã. A vegetação das margens desses rios é, em geral, caracterizada pela presença de juçarais/bambuzais, vegetação típica de várzea, ou mata de sítios, quando há substituição, em caso de construções (PINHEIRO-SOUSA, 2015).

A área (Figura 1) está delimitada ao Norte pelo Parque Estadual do Bacanga, ao Sul pela localidade do Rio Grande, a Leste pela BR-135 e a Oeste pelo Distrito Industrial de São Luís, possuindo um total de 1.8131 ha (VASCONCELOS, 1995). Localiza-se na latitude 04°13'30"S e longitude 44°47'48"W, pertencendo à Microrregião do Médio Mearim e Mesorregião do Centro Maranhense (MARANHÃO, 2009).

**Figura 1:** Mapa da região da APA do Maracanã, São Luís-MA.



Fonte: SEMA, 2012

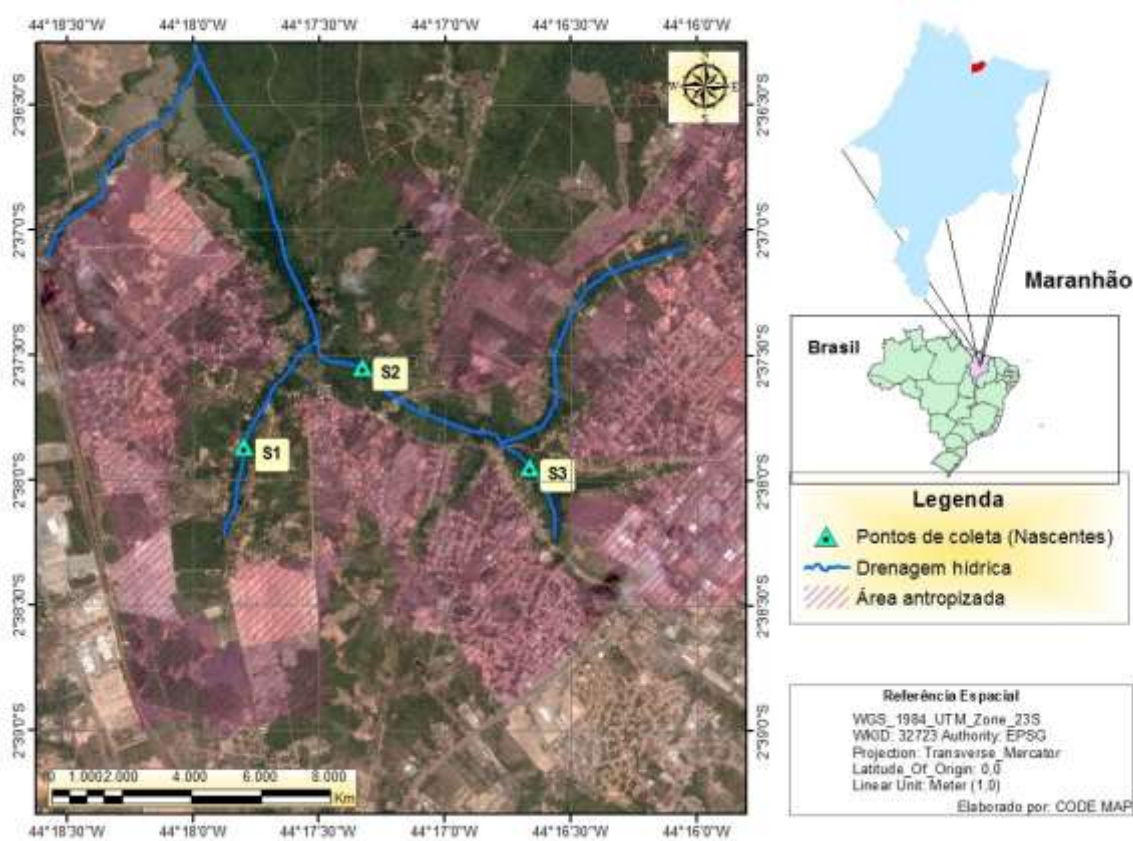
A comunidade do bairro do Maracanã é de classe média baixa. No bairro é possível encontrar ruas sem estrutura básica como água encanada, esgoto e asfalto. Uma parte da sociedade trabalha no Distrito industrial, por estar situado próximo à localidade e outra parte, sobrevive da venda da juçara e do turismo (SANTOS; SANTOS, 2011).

Foram observadas três nascentes (Figura 2), pontos foram nomeados de S1, S2 e S3 (Figura 3). Na nascente situada no ponto S1, foi observada uma área relativamente impactada, porém com bastante área verde ainda preservada e poucas residências próximas; no S2 observou-se menor área com menor área de vegetação preservada e muitas residências nas proximidades, além de descargas de efluentes na nascente; já no S3 foi observado uma área de vegetação bem extensa, mas com grande indício de desmatamentos no entorno para construção de casas. Estas áreas devem ser consideradas como vulneráveis, uma vez que a maioria está exposta às interferências antrópicas, como utilização da água para realizar atividades cotidianas, plantio de espécies vegetais exóticas, construção de taludes para

desenvolver a prática de piscicultura e desvios do fluxo de água para irrigação (SOARES, 2010).

Além disso, o crescimento populacional em consequência da expansão urbana, construção de estradas e edificações, ausência de saneamento básico, lançamento de esgotos domésticos, má disposição do lixo no ambiente, erosão do solo e assoreamento, lavagem de veículos e roupas e o surgimento de novos povoados por meio de ocupações irregulares aumenta ainda mais a degradação ambiental (VINHOTE, 2008).

**Figura 2:** Mapa da região da APA do Maracanã com destaque para os pontos de coleta nas nascentes



**Fonte:** Campos (2017)

#### 4.2 Normas e conduta para o uso dos organismos-teste

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do Maranhão (protocolo nº 20/2017) e seguiu as normas que regem esse comitê.

Além disso, também foi solicitada licença junto à Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Naturais – SEMA (protocolo nº 126750/17), para a utilização da água das nascentes, devido à sua condição de área protegida, obedecendo a Instrução Normativa nº 154 de 01/03/07 do IBAMA e a Lei Estadual nº 9.413 de 13 de julho de 2011.

**Figura 3:** Locais de amostragem na Área de Proteção Ambiental do Maracanã, São Luís-MA. (A) S1, (B) S2 e (C) S3,



**Fonte:** Arquivo Pessoal

#### *4.3 Coleta e análise da água*

As amostras de água foram coletadas em fevereiro e setembro de 2017, considerando os períodos chuvoso e seco, em três nascentes situadas na APA do Maracanã. As nascentes escolhidas como pontos de coleta levaram em consideração a acessibilidade, além do impacto observado, tais como construções, desmatamentos e acúmulo de lixo.

As amostras de água foram coletadas a cada 48h, durante os 7 dias de cada ensaio, em galões de plástico com capacidade para 20 litros e transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia do curso de Oceanografia do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão, onde foram realizados os ensaios ecotoxicológicos.

Uma amostra de água foi coletada a aproximadamente 30 cm de profundidade da superfície da água, acondicionadas em frascos esterilizados de boca larga com tampas esmerilhadas e capacidade para 250 mL de água, durante os ensaios dos períodos seco e período chuvoso, e levada ao Laboratório de Água e Alimentos da UEMA para a análise microbiológica.

As análises foram feitas pelo método colilert, que tem como princípio a identificação dos microrganismos pela análise de suas enzimas típicas, sendo o tempo estimado 24 h. O meio contém dois substratos para identificar as enzimas: o cromogênico

orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONGP) e fluorogênico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronídeo (MUG), que detectam as bactérias do grupo coliforme total em amostras de água (SILVA *et al.* 2010).

#### 4.4 Ensaio ecotoxicológicos

Os exemplares da espécie *Danio rerio* foram obtidos de cultivo do Laboratório de Ecotoxicologia do Curso de Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão, onde os organismos eram mantidos sob condições constantes (fotoperíodo 12c:12e; temperatura de 23°C; aeração constante e alimentação). A espécie foi escolhida em função da existência de protocolos de procedimentos metodológicos estabelecidos pela ABNT (NBR 15499), por estar disponível comercialmente, ser facilmente criado em laboratório e apresentar alta sensibilidade a substâncias tóxicas.

Os testes ecotoxicológicos foram conduzidos em salas climatizadas do Laboratório de Ecotoxicologia do curso de Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA. Os bioensaios foram realizados de acordo com as normas da ABNT (NBR 15499) para experimentos, com os protocolos da Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD, 2008).

Para a avaliação ecotoxicológica crônica, foram realizados dois ensaios em laboratório, um no período chuvoso e um no período seco, utilizando 48 exemplares da espécie *Danio rerio*. Os ensaios tiveram duração de durante 7 dias e os peixes foram expostos às amostras de água coletadas *in situ*, a cada 48h, caracterizando um ensaio semi-estático.

Foram monitorados diariamente os valores de oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água para a validação do experimento. Foi registrada a biometria de cada exemplar, mensurando o comprimento total, comprimento padrão e peso com intuito de verificar a relação peso, comprimento dos peixes e a quantidade de água necessária para a realização do teste (Figura 4).



**Figura 4:** Espécime de *Danio rerio* medido no Laboratório de Ecotoxicologia da UFMA



**Fonte:** Arquivo pessoal

Com as amostras de água das três nascentes foram realizados ensaios crônicos, sendo 3 grupos teste, com 12 peixes cada um. Para observar se ocorriam diferenças quando se utilizava água limpa, foi conduzido um grupo controle com a mesma quantidade de peixes que dos grupos teste, utilizando para tanto 500mL de água filtrada da torneira e 500mL de água destilada (Figura 5).

**Figura 5:** Ensaio ecotoxicológico realizado no Laboratório de Ecotoxicologia da UFMA.



**Fonte:** Arquivo pessoal

Ao término dos testes ecotoxicológicos, os organismos-teste foram anestesiados com solução anestésica de óleo de cravo. Posteriormente foi retirado o sangue por punção caudal com o auxílio de uma seringa de insulina para a realização do teste do micronúcleo. Em seguida, cada exemplar foi eutanasiado com hidrocloreto de benzocaína (método de eutanásia citado na Resolução N° 714 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária). Na sequência, os peixes foram fixados por inteiro em formaldeído a 10%.

#### *4.5 Teste do micronúcleo (MNs)*

O sangue foi coletado por punção caudal com o auxílio de seringa de insulina e gotejado sobre uma lâmina para ser feito o esfregaço e aguardou-se a secagem do material. A lâmina foi submetida a um banho de corante Rosenfield modificado por 6 minutos e, em seguida colocado em água destilada por 4 minutos. Posteriormente, foi colocado para secar em temperatura ambiente de 25° C.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio de luz para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. A análise citogenética foi realizada em microscópio de luz em objetiva de 100x com contagem de 2000 células por lâmina (GRISOLIA, 2002).

Os MNs foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech *et al.* (2000).

#### *4.6 Análise histológica*

No Laboratório de Morfofisiologia Animal do Departamento de Química e Biologia da Universidade Estadual do Maranhão, os peixes foram descalcificados em ácido nítrico a 10% por seis horas. Em seguida, o material foi desidratado em série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%), diafanizado em xilol, impregnado e emblocado por inteiro em parafina. Foram feitos cortes transversais dos blocos para a confecção das lâminas de 5µm de espessura e estas foram coradas com Hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) para posterior leitura e análise das lesões.

Nos estudos morfológicos foram analisadas as brânquias. As secções histológicas foram analisadas em toda sua extensão em busca de alterações morfológicas que fossem representativas do efeito da água das nascentes dos rios no tecido animal, sempre comparando estas alterações com o padrão de organização dos órgãos em condições normais. Para a análise morfológica, as lâminas histológicas foram analisadas em toda sua extensão e fotografadas 10 por campo ao acaso em cada animal. As lesões encontradas foram avaliadas, quantificadas e classificadas quanto ao grau de severidade e possibilidade de recuperação: alterações consideradas leves, que não alteram a função do tecido; alterações moderadas, que alteram parcialmente a função do tecido; e alterações severas, que alteram totalmente a função do tecido (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Foi calculado o Índice de Alteração Histológica (IAH) baseado na severidade de cada lesão por meio da fórmula:  $IAH = 1 \times \sum I + 10 \times \sum II + 100 \times \sum III$ , em que: I refere-se às alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; II, às alterações de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e III, às alterações de estágio III, muito severas e irreversíveis (Tabela 1).

A partir do valor do IAH, classificaram-se as lesões histológicas branquiais em cinco categorias (Tabela 2), segundo Poleksic; Mitrovic – Tutundzic (1994). Para todas as contagens e medições foram calculados valores médios e desvios-padrão, seguidos de análise estatística.

**Tabela 1.** Classificação das alterações histológicas branquiais segundo Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994).

| Estágio I  | Estágio II   | Estágio II                                     |
|--|--|--|
| Congestão dos vasos sanguíneos                     | Hiperplasia e hipertrofia das células de muco      | Telangectasia<br>Necrose e degeneração celular |
| Levantamento do epitélio respiratório              | Hiperplasia e hipertrofia das células de cloreto   | Aneurisma lamelar                              |
| Fusão incompleta das lamelas                       | Fusão completa das lamelas                         |  |
| Dilatação do seio venoso                           | Espessamento descontrolado do tecido proliferativo |  |
| Parasito   | Rompimento do sistema de células pilares           |  |
| Hipertrofia e hiperplasia do epitélio respiratório |  |  |

**Tabela 2.** Classificação da severidade das lesões por categoria de IAH, segundo Poleksic e Mitrovic Tutundžic (1994).

| Valores | Classificação                              |
|---------|--|
| 0-10    | Funcionamento normal do tecido             |
| 11-20   | Dano leve ara moderada do tecido           |
| 21-50   | Modificação moderada para severa do tecido |
| 51-100  | Modificação severa do tecido               |
| >100    | Dano irreparável do tecido                 |

#### *4.7 Análise Estatística*

Foi conduzido o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com o programa software BioEstat 2.0, caracterizando as amostras com distribuição normal. Para as amostras com distribuição normal (Brânquias), realizou-se o Teste *t* de Student para observar se havia diferenças significativas entre os pontos de coleta escolhidos e o controle e Anova, para comparar as diferenças significativas entre os pontos estudados e entre os períodos seco e chuvoso ( $p < 0,05$ ).

Para as amostras que não possuíram distribuição normal, Os dados entre os períodos sazonais e entre as áreas e os scores das classes de danos no DNA foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com o uso do software BioEstat 2.0. O resultado é considerado se observado diferença significativa de no mínimo  $p \leq 0,05$  entre os dados analisados.

## 5 RESULTADOS

No ensaio realizado no período chuvoso não houve mortalidade dos indivíduos em nenhum dos pontos durante os 7 dias. Entretanto houve mudanças de comportamentos dos peixes nos três pontos testados, tais como agitação e agressividade uns com os outros.

Já no ensaio realizado no período seco, houve a mortalidade de 1 indivíduo no ponto 2, entretanto, não representou resultado relevante, uma vez que representou menos de 10% de mortalidade. Todavia, também houve mudanças de comportamentos dos peixes nos três pontos testados, tais como agitação e agressividade.

Os dados das variáveis físico-químicas das amostras ambientais de água também foram considerados normais (Tabela 3).

**Tabela 3:** Média das variáveis física química das amostras de água das nascentes situadas nos três pontos da APA do Maracanã.

| PONTOS | PARÂMETROS | PERÍODO SECO | PERÍODO CHUVOSO | VMP*    | UNIDADES |
|--------|------------|--------------|-----------------|---------|----------|
| S1     | pH         | 6,5          | 7,8             | 5,0-9,0 | -        |
|        | T°C        | 25           | 25              | -       | -        |
|        | OD         | 5,7          | 5,6             | ≥5,0    | mg/L O2  |
| S2     | pH         | 5,9          | 7,2             | 5,0-9,0 | -        |
|        | T°C        | 25           | 25              | -       | -        |
|        | OD         | 5,3          | 5,5             | ≥5,0    | mg/L O2  |
| S3     | pH         | 6,3          | 6,5             | 5,0-9,0 | -        |
|        | T°C        | 25           | 25              | -       | -        |
|        | OD         | 6.1          | 5.9             | ≥5,0    | mg/L O2  |

VMP = Valor máximo permitido, segundo resolução CONAMA (n°357).

Os valores de pH foram menores no período seco que no período chuvoso, com destaque para S1, com média de 7,8, no período seco. Quando se observa os níveis de oxigênio dissolvido, percebe-se que eles são menores nas nascentes durante o período seco, destacando a nascente S2.

Os valores das variáveis microbiológicas das amostras de água durante os períodos seco e chuvoso encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4.** Valores microbiológicos das amostras de água dos três pontos das nascentes da APA do Maracanã no período chuvoso e seco.

| Pontos | Nº Coliformes totais (NMP*) encontrado a cada 100mL |       | Nº permitido de Coliformes totais a cada 100mL * | Nº permitido de Coliformes totais a cada 100mL ** |
|--------|---|-------|--|---|
|        | Chuvoso   | Seco  |  |   |
| S1     | 24.196  | 15,80 | 200  | 0   |
| S2     | 24.196  | >2500 | 200  | 0   |
| S3     | 24.196  | 62,00 | 200  | 0   |

\*Valores permitidos pela Resolução 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde

\*\*Valores permitidos pela Resolução CONAMA nº 357

Nos valores obtidos para coliformes totais durante os dois períodos de teste, foram observados níveis elevados de coliformes no período chuvoso em todas as nascentes estudadas. No período seco, houve diminuição nos valores para coliformes, porém a nascente S2 obteve resultado superior a 2500/100mL, ainda ficou acima das legislações vigentes.

As lesões genotóxicas (micronúcleo e anomalias nucleares) foram mais evidentes durante o período chuvoso, com valores elevados nas três nascentes estudadas. Já no período seco, houve diminuição nos valores, porém ainda foram considerados altos, sendo a nascente S2 mais representativa. Houve diferença significativa entre as nascentes S2 e S3 durante o período chuvoso (Kruskal-Wallis,  $p=0,0225$ ), entretanto não houve diferença significativa durante o período seco (Kruskal-Wallis  $p=0,235$ ). Quando comparados os períodos chuvoso e seco, também não houve diferença significativa, com médias semelhantes, porém houve diferença quando comparadas a nascentes com o controle.

As lesões genotóxicas e anomalias nucleares nos eritrócitos observadas constam nas tabelas 5 e 6, e figura 6.

**Tabela 5.** Quantidade total, média e desvio padrão dos eritrócitos com lesões genotóxicas no período chuvoso (n=12).

| LESÕES                            | CONTROLE                               | S1  | S2   | S3                                      |
|-----------------------------------|--|---|--|---|
| <b>Micronúcleo</b>                | 5(0,4 <sup>a</sup> ±0,6 <sup>b</sup> ) | 116 (9,7 <sup>a</sup> ±0,5 <sup>b</sup> ) | 119 (9,9 <sup>a</sup> ±0,9 <sup>b</sup> )* | 91(7,7 <sup>a</sup> ±1,5 <sup>b</sup> ) |
| <b>Notched<br/>(Entalhada)</b>    | 0 (0±0)                                | 36( 3,08±0,9)                             | 31(2,66±1,23)                              | 55 (4,58±1,56)                          |
| <b>Lobed<br/>(Lobulado)</b>       | 2(0,16±0,38)                           | 18 (1,66±0,88)                            | 18 (1,66±0,98)                             | 10 (0,83±0,71)                          |
| <b>Blebbled<br/>(Fragmentado)</b> | 0 (0±0)                                | 21 (2±1,53)                               | 28 (2,5±0,79)                              | 22 (1,83±0,71)                          |
| <b>Vacuoled<br/>(Binucleado)</b>  | 1(0,8±0,28)                            | 18 (1,66±1,23)                            | 19 (1,75±1,21)                             | 8 (0,66±0,65)                           |

a= média b= desvio padrão

\*valor significativo em relação ao controle e ao ponto S3

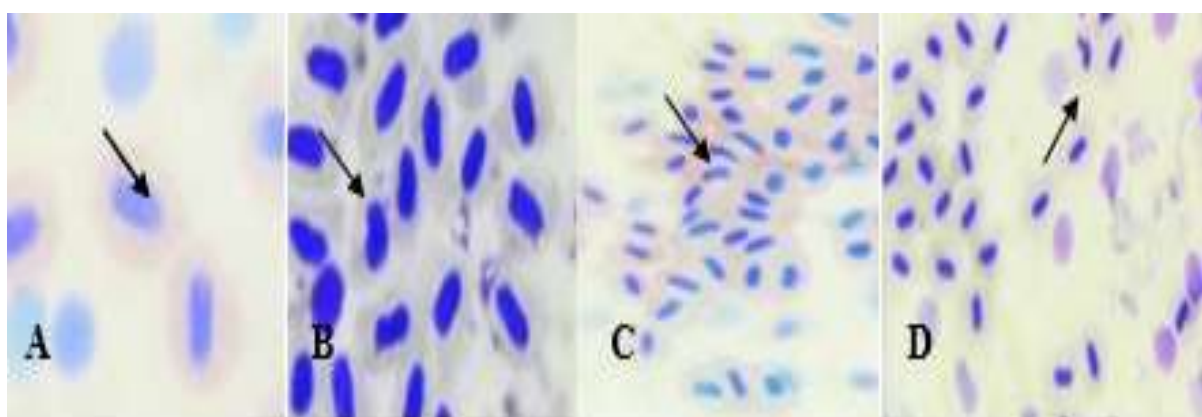
**Tabela 6.** Quantidade total, média e desvio padrão dos eritrócitos com lesões genotóxicas no período seco (n\*\*=12).

| LESÕES                            | CONTROLE<br>M/DP                        | S1<br>M/DP                                | S2<br>M/DP                                 | S3<br>M/DP                                |
|-----------------------------------|---|---|--|---|
| <b>Micronúcleo</b>                | 3(0,1 <sup>a</sup> ±0,38 <sup>b</sup> ) | 70(5,83 <sup>a</sup> ±1,26 <sup>b</sup> ) | 82(6,33 <sup>a</sup> ±1,07 <sup>b</sup> )* | 76(6,33 <sup>a</sup> ±1,07 <sup>b</sup> ) |
| <b>Notched<br/>(Entalhada)</b>    | 0(0±0)                                  | 1(0,08±0,28)                              | 2(0,16±0,38)                               | 2(0,16±0,38)                              |
| <b>Lobed<br/>(Lobulado)</b>       | 0(0±0)                                  | 3(0,25±0,45)                              | 0(0±0)                                     | 0 (0±0)                                   |
| <b>Blebbled<br/>(Fragmentado)</b> | 0(0±0)                                  | 0(0±0)                                    | 0(0±0)                                     | 0(0±0)                                    |
| <b>Vacuoled<br/>(Binucleado)</b>  | 0(0±0)                                  | 0(0±0)                                    | 0(0±0)                                     | 20,16±0,38)                               |

a= média b= desvio padrão \*valor significativo em relação ao Controle

\*\*n=11, no ponto S2, devido à mortalidade de um exemplar.

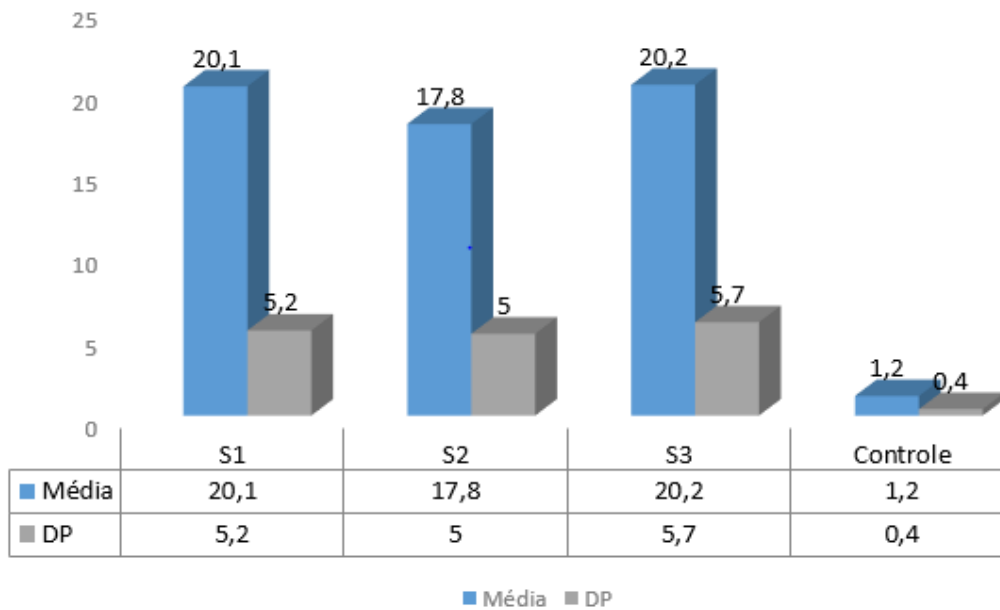
**Figura 6.** Imagens dos danos genotóxicos e anomalias nucleares mais observadas em *Danio rerio*. Em A, Micronúcleo (seta). B, brotamento (seta); C, fragmentado (seta) e D, binucleado (seta). 50  $\mu$ m.



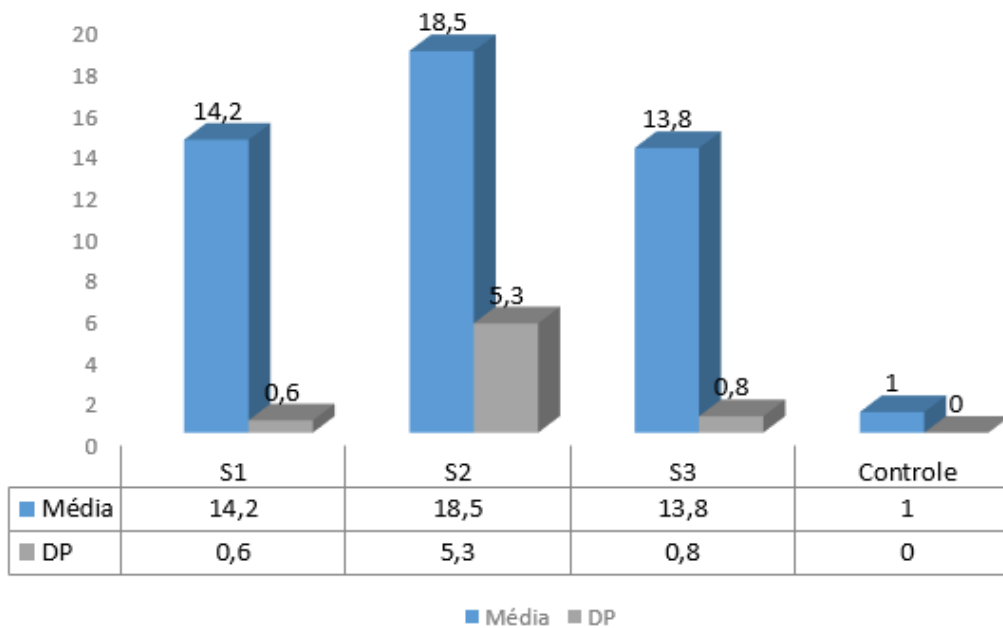
**Fonte:** Arquivo pessoal



**Gráfico 1:** Média e desvio padrão dos IAH para brânquias de *Danio rerio*, durante o período chuvoso, no ano de 2017.

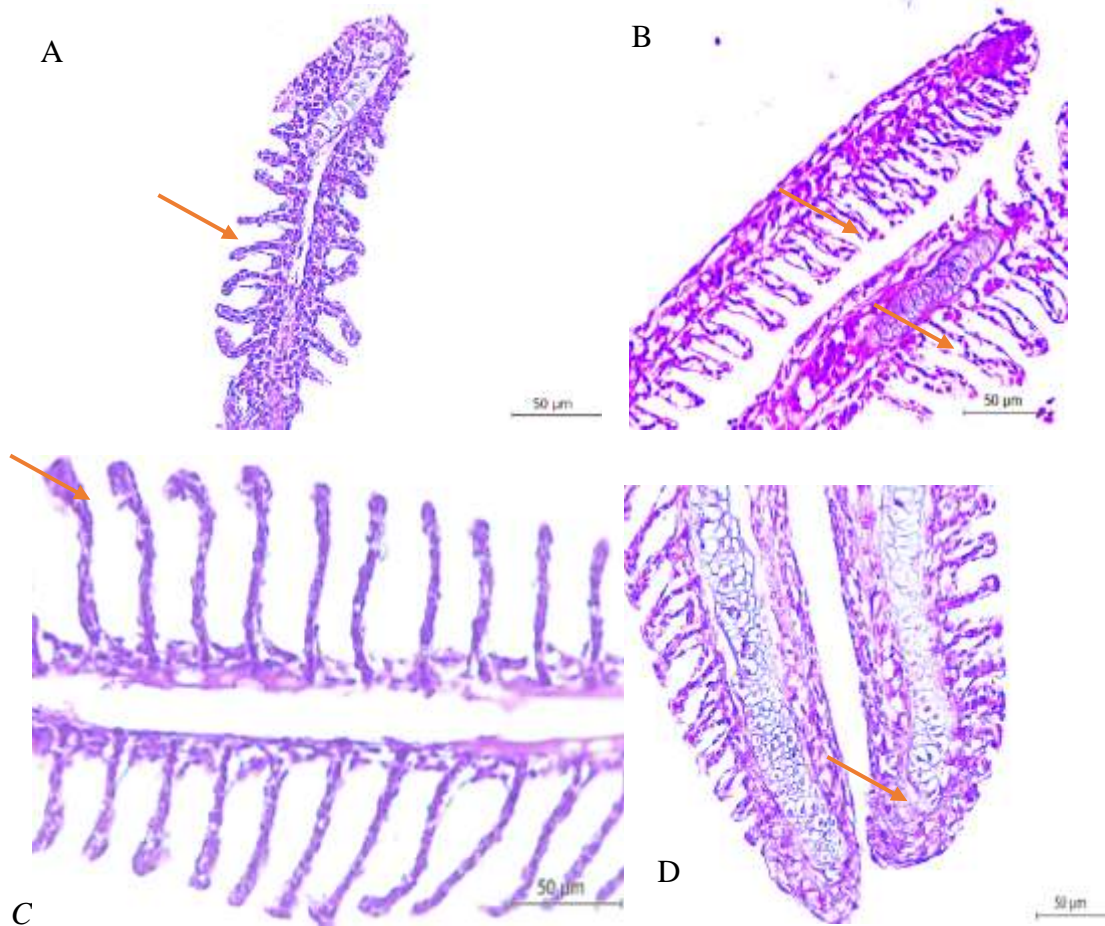


**Gráfico 2:** Média e desvio padrão dos IAH para brânquias de *Danio rerio*, durante o período seco, no ano de 2017.



\* Valor significativo em relação ao controle e aos pontos de coleta

As médias dos índices de alteração histológica (IAH) foram mais representativas durante o período chuvoso, sendo encontrados valores elevados deste índice em todas as nascentes estudadas. Entretanto, apesar desses valores diminuírem no período seco, houve um valor representativo para a nascente S2, com 18,5. Porém todos os resultados ficaram dentro da mesma categoria de classificação de severidade das lesões, com dano leve a moderado do tecido. Não houve diferença significativa dos pontos, durante o período chuvoso (Anova,  $p=0,307399$ ), porém houve diferença significativa do período seco (Anova,  $p=0,0009$ ). Quando comparados os períodos, também houve diferença significativa (Anova,  $p=0,000137$ ), com destaque para maior contaminação no período chuvoso. Além disso, houve diferença significativa entre os pontos estudados e o controle, tanto no período chuvoso quanto no período seco, com médias e variâncias diferentes entre si, observadas no Teste  $t$  de Student.



**Figura 7.** Fotomicrografia de branquias. Em A, descolamento do epitélio respiratório (seta). Em B, deslocamento do epitélio, hiperplasia epitelial (setas); C, congestão (seta) e D, fusão total das lamelas (seta), H.E.

As lesões encontradas tanto no período seco quanto no chuvoso foram as mesmas, diferindo somente na intensidade de observações entre os dois períodos. As lesões mais comumente encontradas foram descolamento do epitélio respiratório, congestão e fusão parcial das lamelas, todas de estágio I. Entretanto, encontrou-se também fusão total das lamelas, caracterizada como lesão de estágio II.

## 6 DISCUSSÃO

Os testes ecotoxicológicos realizados nos períodos chuvoso e seco tiveram duração de 7 dias, um ensaio curto, apesar de ser considerado crônico, pois de acordo com as normas da ABNT (NBR 15499), para ser considerado crônico, o ensaio deve conter mais de 72h de duração, a fim de observar os efeitos no comportamento ou mesmo letais ao organismo. No presente trabalho foram utilizados indivíduos adultos e, desta forma, no teste foram observadas mudanças de comportamento e danos letais ao organismo.

Quanto à avaliação da toxicidade, ao final dos ensaios qualitativos, determinou-se que as substâncias tóxicas presentes nas águas das nascentes oferecem risco a espécie alvo *Danio rerio* a nível tecidual. Pois, a constatação de ausência de toxicidade após o ensaio crônico não representa ausência de efeito subletal (BURATINI; BRANDELLI, 2006), uma vez que o acúmulo de substâncias químicas pode determinar outros efeitos deletérios em níveis organizacionais menores (moléculas, células e tecido), que ainda não foram capazes de se manifestar no organismo como todo (DECAPRIO, 1997).

A avaliação da toxicidade aquática é um procedimento no qual as respostas dos organismos aquáticos são usadas para detectar e medir os efeitos de uma ou mais substâncias, resíduos ou fatores ambientais, sozinhos ou em combinação, durante um determinado tempo (AUGUSTO, *et al.* 1997). Esses efeitos resultam em alterações bioquímicas e fisiológicas no sangue dos peixes, o que pode indicar o seu estado fisiológico. Desta forma, os eritrócitos dos peixes têm se mostrado adequado para a análise de micronúcleos sendo adequados para o teste (UDROIU, 2006; POLARD *et al.*, 2011). Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose, onde sua formação resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais ou, ainda, de falhas no fuso mitótico. Esses fragmentos são muito utilizados porque são capazes de detectar alterações no ambiente, uma vez que são induzidos por agentes tóxicos, e vários estudos têm demonstrado o valor dos micronúcleos como biomarcadores em peixes (ANDRADE *et al.*, 2004; FERRARO *et al.*, 2004; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

No presente trabalho foram observados muitos eritrócitos com micronúcleo, uma vez que dentro de uma contagem de 2000 células de cada lâmina visualizada foram encontradas, no ensaio realizado no período chuvoso, 119 células contendo o micronúcleo, nos 12 peixes testados na nascente S2. Já no período seco, apesar de ter sido observada

quantidade menor, também foram encontradas lesões mutagênicas e anomalias nucleares. Houve diferença significativa entre as nascentes durante o período chuvoso (Kruskal-Wallis,  $p=0,0225$ ); entretanto, não houve diferença significativa durante o período seco (Kruskal-Wallis  $p=0,235$ ). Isso pode estar relacionado à quantidade de efluentes que provavelmente estão sendo despejados na forma *in natura* nesta nascente, uma vez que foi observada uma adutora de esgoto na mesma. Esses poluentes podem despejar grande quantidade de agentes genotóxicos.

Os agentes genotóxicos causam modificações nos eritrócitos, ocasionando dano ao DNA e, caso não ocorra reparo das lesões, pode ser iniciada uma cascata de consequências biológicas nas células, órgãos e no animal como um todo, atingindo a população e comunidade do organismo. Tais danos podem ser associados à redução do crescimento corporal, desenvolvimento anormal, diminuição da sobrevivência de embriões, larvas e animais adultos (LEE; STEINERT, 2003). Assim, o aumento da frequência de células micronucleadas é um marcador de genotoxicidade e pode refletir exposição a agentes com clastogênicos ou aneugênicos de ação (BOMBAIL *et al.*, 2001).

Os resultados observados comprovam o emprego do teste do micronúcleo como sendo um instrumento de monitoramento rápido (SILVA; NEPONUCENO, 2010), e o peixe da espécie *Danio rerio*, um biomonitor eficiente para detectar a presença de agentes genotóxicos no meio ambiente aquático. Desta forma, a presença de micronúcleo nos ambientes estudados mostra íntima correlação com agentes genotóxicos, sugerindo contaminação nos locais.

Durante as pesquisas dos micronúcleos é possível analisar também as anomalias nucleares sugerindo que essas sejam levadas em consideração por estarem relacionadas aos processos de citotoxicidade, ações sobre a divisão celular e genotoxicidade (CARRASCO, *et al.* 1990; SOUSA; FONTANELLI, 2003). No presente trabalho, as alterações observadas com maior frequência foram notched e fragmentado, no período chuvoso e lobulada e notched, no período seco.

O número elevado de lesões mutagênicas e anomalias nucleares observadas nos testes citogenéticos, sugere que as nascentes aqui analisadas apresentam grandes quantidades de substâncias com potencial genotóxico, tanto no período chuvoso quanto no período seco. Foram observados maior índice de alterações mutagênicas e anomalias nucleares nos ensaios realizados no período chuvoso, sugerindo que os contaminantes podem ter sido carregados pela

chuva até as nascentes; entretanto ainda que em menor quantidade, também foram observadas essas alterações durante o período seco, o que nos leva a observar que existem contaminações nos três pontos ao longo dos dois períodos, pois a frequência elevada de micronúcleos traduz danos genotóxicos irreversíveis, o que em longo prazo pode comprometer a sanidade dos peixes, uma vez que estes organismos foram submetidos a ensaios curtos, de apenas 7 dias, em longo prazo os danos podem levar a morte do animal. Embora as origens das anormalidades não tenham sido identificadas, vários estudos suportam a hipótese de que isso reflete os eventos genotóxicos (FERRARO *et al.* 2004).

O processo de alterações do meio aquático pode interferir de maneira significativa na sanidade dos peixes, acarretando, também, uma série de alterações morfológicas reversíveis ou irreversíveis à fisiologia de seus órgãos, como as brânquias que constituem um órgão vital para os peixes, uma vez que é o principal ponto de trocas gasosas, além de estarem envolvidas no processo de osmorregulação e excreção de produtos nitrogenados. Sendo assim, é um importante alvo de estudo para observar as alterações fisiológicas nos tecidos desses organismos, pois estão em contato direto com o ambiente aquático (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Quando se observa a histologia das brânquias, nota-se que ela apresenta vários tipos celulares no epitélio, tais como células pavimentosas, células mucosas, células de cloreto, células não diferenciadas e células neuroepiteliais (LICHTENFELS, 1996). Se o ambiente não oferece equilíbrio ou está impactado, pode levar a ocorrência de alterações na morfologia normal desse órgão como forma de adaptação às modificações no ambiente.

Segundo Polesksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), as mudanças nas estruturas das brânquias dos peixes podem ser utilizadas para monitorar os efeitos subletal e crônico de poluentes, principalmente nos casos em que outros métodos de avaliação não são satisfatórios.

As principais lesões encontradas nas brânquias dos peixes estudados no ensaio foram congestão dos vasos sanguíneos, levantamento do epitélio respiratório, hiperplasia do epitélio lamelar, fusão incompleta e completa das lamelas. A maioria das lesões ocorreu durante o período chuvoso, no ponto S3, uma vez que, segundo os moradores, esta área está cada vez mais impactada devido aos projetos de construção realizados no entorno. No período chuvoso, foi encontrado maior percentual de lesões, sendo as mais frequentes o levantamento do epitélio respiratório, fusão parcial das lamelas e congestão, todas de estágio I, e fusão completa das lamelas secundárias, de estágio II. Já no período seco, foram encontradas as

mesmas lesões citadas, porém em menor quantidade, sugerindo que a água da chuva esteja levando uma série de contaminantes, levando os peixes a desenvolverem lesões em um curto período de tempo.

A elevação epitelial é uma das primeiras alterações que ocorrem quando o animal está sob algum tipo de estresse, pois se trata de uma lesão inicial em resposta ao estresse. E como foi um ensaio de curta duração, já era esperado que se observasse com mais frequência. Além dessa alteração, a congestão dos vasos sanguíneos, hiperplasia do epitélio lamelar e fusão incompleta e completa das lamelas foram alterações frequentes. Todas estas se classificam de acordo com Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994) em lesões de estágio I: alterações leves que não comprometem o funcionamento normal do órgão, permitindo a recuperação da estrutura e da função dos tecidos branquiais caso haja melhoria nas condições ambientais.

Os valores médios de IAH nos pontos de coleta mostraram que a maior incidência de lesões nas brânquias foi encontrada durante o período chuvoso, no S3, com a média de 20,2, indicando dano leve ou moderada do tecido, caracterizando ação mais intensa de xenobióticos nas brânquias dos espécimes neste ponto, o que leva a sugerir uma maior contaminação por efluentes domésticos nesta área.

Os pontos S1 e S2, com média de 20,1 e 17,75, respectivamente, apresentaram um resultado em que se constatou também uma danificação leve a moderada do tecido. Já o controle obteve média de 1,2, o que mostra a partir da classificação de Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994), que não há dano tecidual, ou seja, há funcionamento normal do tecido. De acordo com Carvalho-Neta *et al.* (2015), a área de Maracanã é próxima a uma indústria de metal e algumas áreas da nascente S1 estão perto de estradas com altos fluxos de tráfego, onde os poluentes de várias fontes podem ser transportados pelo vento e pela água da chuva, o que pode ajudar a explicar a contaminação desta nascente no período chuvoso.

No período seco houve uma diminuição do IAH, onde a maior média foi encontrada para o S2, com 18,5, sugerindo maior contaminação neste ponto. Entretanto, se levarmos em conta o período de exposição dos peixes a estes contaminantes, houve comprometimento grave, pois os mesmos foram expostos por apenas 7 dias.

Sendo assim, os peixes que vivem nestes ambientes, bem como os que dependem direta ou indiretamente deles, podem estar seriamente comprometidos, visto que sua exposição é constante.

Os testes estatísticos mostraram que não houve diferença significativa entre os pontos durante o período chuvoso ( $p= 0,307399$ ), porém houve diferença significativa entre os pontos durante o período seco ( $p= 0,000923$ ). Quando comparamos os dois períodos em que foram realizados os testes, percebe-se que também houve diferença significativa ( $p= 0,000137$ ). Quando comparados cada ponto com o controle, tanto no período seco quanto no período chuvoso, percebe-se que há diferença significativa, entre eles, visto que a diferença de lesões é muito grande entre os pontos S1, S2 e S3 comparados ao controle, no período chuvoso e no período seco (com médias e variâncias diferentes entre si). Deste modo, podemos observar que o nível de xenobióticos variou entre os pontos estudados, causando lesões de estágio I e II, nos períodos seco e chuvoso nos três pontos, mas com incidências diferentes.

À vista disso, em ensaio de curta duração era esperado que se encontrasse um número maior dessas lesões de estágio I, porém também foram encontradas lesões de estágio II, sendo preocupante, uma vez que em um ensaio de apenas 7 dias encontrou-se lesões deste tipo, os organismos aquáticos que possuem estas nascentes como habitat podem estar com as funções fisiológicas seriamente comprometidas.

As brânquias desempenham um papel fundamental para as trocas gasosas e osmorregulação, quando esta função está prejudicada, estas alterações histológicas podem afetar diretamente na sobrevivência dos peixes (MEYERS; HENDRICKS, 1985).

As alterações morfológicas das brânquias, em resposta a mudanças ambientais, podem representar estratégias adaptativas para conservação de algumas funções fisiológicas. Por conseguinte, os resultados obtidos levam a sugerir que os organismos estavam tentando minimizar os danos aos órgãos.

As lesões branquiais, mutagênicas e anomalias nucleares estão correlacionadas com o alto índice de contaminação das nascentes. Desta forma, a utilização de indicadores físico-químicos e microbiológicos da água fornecem os dados que foram observados *in situ*. Para estabelecer os padrões de contaminação dessas nascentes.

Foram consideradas as Resoluções do CONAMA n° 357/2005 e resolução n° 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde, que estabelecem as diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água, determinando condições e padrões de lançamento de efluentes, visando à proteção das comunidades aquáticas (BRASIL, 2002).

O pH das nascentes S1 e S2 durante o ensaio realizado no período chuvoso esteve mais próximos da neutralidade, enquanto S3 possuiu o pH mais baixo. No período seco, os



parâmetros também não diferiram muito do período chuvoso. Os parâmetros de temperatura foram controlados em laboratório, devido a isso não houve diferença entre os pontos.

Nas observações sobre as concentrações de oxigênio dissolvido, ainda que tenham sido controladas em laboratório, houve diferenças, uma vez que esta variável pode apresentar interferências de bactérias, pois o processo de deterioração de material orgânico presente é realizado através da ação oxidante de bactérias aeróbicas, com bactérias consumindo o OD, convertendo-o em moléculas mais simples como dióxido de carbono e água (BRANCO, *et al.*, 2007). O oxigênio dissolvido tem um papel fundamental na distribuição, sobrevivência e fisiologia da fauna e flora dos ecossistemas aquáticos. O gás apresenta além dessa importância biológica, a função de participação em inúmeras reações químicas. Sua dissolução na água depende das interações ar/água, temperatura e pressão atmosférica (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008). As taxas de oxigênio também são controladas pelos processos de respiração, nitrificação e oxidação química e o consumo de oxigênio é compensado pela fotossíntese, bem como, a aeração provocada pelos fluxos dos cursos d'água pouco profundos (FIORUCCI; FILHO, 2005).

No período chuvoso, as concentrações não diferiram entre os pontos, entretanto, no período seco houve diferença acentuada no S2 em relação aos outros pontos, pois neste ponto a água estava visivelmente mais comprometida, o que pode levar a sugerir maior contaminação e, conseqüentemente, maior quantidade de micro-organismos que estejam utilizando o oxigênio disponível, o que torna esta água um veículo de transmissão de doenças, por isso a sua qualidade microbiológica torna-se um indispensável para a saúde pública. Para observar e mensurar a contaminação de corpos d'água por dejetos humanos empregam-se indicadores microbiológicos, principalmente os microrganismos do grupo coliformes, uma vez que a contaminação por estes tipos de microrganismos sugere contaminação fecal e, portanto, derramamento de esgotos de forma *in natura*.

Martins (2005) atribui ao lançamento de esgotos domésticos a altas concentrações fecais, mas revela que a intensidade das chuvas, dilui as águas, diminui a salinidade, carrega as bactérias do solo e favorece a proliferação. LIAO *et al.* (1984) também confere à salinidade a capacidade de autodepuração, e justifica a contaminação dessa área pelo menor volume hídrico e menor salinidade, uma vez que, a maré não sobe até a cabeceira, mas não isenta o lançamento de detritos fecais nessa região.

De acordo com Mormul *et al.*, (2006), a ocorrência de coliformes na água consumida em áreas rurais representa um risco possível para a saúde, uma vez que existe um

número alto de doenças de veiculação hídrica causadas por bactérias do grupo coliformes. Além disso, segundo eles, entre todas as doenças no país 60% têm origem no uso de águas contaminadas.

Os valores encontrados do NMP de coliformes termotolerantes por 100mL nas análises microbiológicas da água superficial das nascentes nos três pontos foram 24.196, nos três pontos, durante o período chuvoso, e 15, 8; >2500 e 62,0, nos pontos S1, S2 e S3, respectivamente, no período seco. De acordo com a Resolução 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde, não é permitido que sejam encontrados coliformes totais para cada 100mL, uma vez que as nascentes são utilizadas para o consumo de forma *in natura*, ou seja, sem nenhum tipo de tratamento, ou mesmo com tratamento simplificado. Assim, nenhuma das três nascentes está de acordo com a legislação, uma vez que o número mais provável estava igual para todos os pontos, durante a coleta no período chuvoso. Já as análises de período seco mostraram valores diferentes, entretanto, também não satisfizeram a resolução.

Segundo a Resolução CONAMA n° 357/2005, também houve resultado acima do permitido para o período chuvoso, uma vez que nenhum dos três pontos está dentro do limite estabelecido pela legislação, com os pontos S1, S2 e S3 apresentando níveis elevados de coliformes. Já no período seco, de acordo com esta resolução, os pontos S1 e S3 estão dentro do limite permitido, uma vez que obtiveram resultados de 15,80 e 62,00/100mL, respectivamente. Entretanto o ponto S2 não obteve um resultado permitido pela legislação, pois foi encontrado um total > 2.500,00 coliformes/100mL, sugerindo intensa contaminação.

Esta contaminação por bactérias do grupo coliformes indica contaminação fecal, uma vez que são organismos que vivem no intestino humano (BRANCO *et al.*, 2006). Este tipo de bactéria não causa dano ao organismo no intestino, pois ela vive em relação ecológica interespecífica chamada comensalismo, onde ela tem alimento e abrigo no órgão, sem que o prejudique (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI *et al.*, 2002). Porém, quando ingerida pode causar várias doenças, entre elas infecções abdominais, infecções urinárias, pneumonia entre outras, podendo levar a óbito por complicações (SOUSA; FONTANELLI, 2006).

Alves *et al.* (2012) afirmaram que a qualidade da água está intimamente ligada à sua utilização, às atividades que são realizadas em seu entorno e ao ambiente do qual cada uma delas faz parte, sugerindo que existem modificações no entorno das nascentes que podem estar contribuindo também para sua degradação. Entretanto, uma nascente deve ser protegida, pois existe uma dimensão mínima da faixa marginal de vegetação nativa a ser preservada (50

m de raio), segundo o Código Florestal (Lei nº 4.771/65) (BRASIL, 1965) em seu artigo 2º e, segundo a Resolução CONAMA 303/2002, artigo 3º, inciso III (BRASIL, 2002).

Deste modo, os resultados obtidos com o teste ecotoxicológico e os biomarcadores estão de acordo com os resultados encontrados sobre a qualidade da água, uma vez que estes foram menos favoráveis no período chuvoso. Entretanto, no período seco, houve uma diminuição das lesões, assim como melhora na qualidade de água, sugerindo que os contaminantes podem ter sido carregados para as nascentes, provocando contaminação mais intensa (MOURA *et al.*, 2009).

No S2 do período seco, houve um número acentuado de lesões nas brânquias e também nos resultados de coliformes na água, mesmo que tenha se constatado diminuição nos outros pontos. Isso pode estar relacionado ao grande nível de contaminação dessa nascente, uma vez que os próprios moradores ao falarem da nascente em questão apontam como área extremamente impactada por escoamento de esgotos, principalmente depois que foram iniciadas obras de um programa de residências no entorno, onde já foram construídas mais de 2 mil residências, no programa “Minha casa, minha vida!”. Essas construções, segundo eles, estão piorando as condições das nascentes situadas na APA, pois, “as estações de tratamento não foram muito bem construídas, então o esgoto é lançado nos córregos e nos riachos”.

Além disso, as construções na área da APA podem ter aumentado a contaminação das águas devido às fossas sépticas necessárias pela falta de saneamento, e as ações antrópicas na área, como desmatamento, que deixaram o solo sem cobertura vegetal, facilitando o carreamento de sedimentos e contaminantes para as nascentes. Além disso, estudos de Carvalho Neta *et al.* (2014), observaram que a dinâmica do ecossistema da APA do Maracanã foi intensamente modificada, com sobrepesca de espécies nativas (por exemplo, tambaqui), a introdução de espécies exóticas, perda de cobertura vegetal e a poluição teve um grande impacto na área e, outro estudo de Carvalho-Neta *et al.* (2012) detectaram a presença de metais pesados em uma área industrial localizado perto da Área Protegida de Maracanã, o que pode estar contribuindo para a redução da qualidade da água dessas nascentes. Desta forma, é importante salientar que a má qualidade da água, além de contaminar os peixes e gerar risco à saúde da população, pode ocasionar uma série de problemas em nível tecidual do peixe devido ao estresse, podendo ocasionar a morte do animal.

Os dados se mostram preocupante, uma vez que se trata de uma área de proteção ambiental. Entretanto, fornecer dados aos órgãos e entidades públicas responsáveis pode dar subsídios para a execução de políticas públicas ambientais voltadas para conservação e

melhoria do recurso ambiental em análise, uma vez que os projetos de manejo implantados na área podem auxiliar em benefícios econômicos, sociais e ambientais.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As nascentes situadas na APA do Maracanã, apesar de serem áreas com dupla proteção, pois estão enquadradas como unidades de conservação de uso sustentável, além disso, as nascentes também são protegidas pela legislação; tem apresentado elevada fragilidade ambiental, se tornando vulneráveis a fatores como aumento da urbanização, crescimento demográfico e exploração nativa.

De acordo com as resoluções CONAMA e do Ministério da Saúde, os resultados da análise microbiológica estão em desacordo com a legislação, indicando valores acima dos permitidos pela legislação para coliformes, principalmente no período chuvoso, o que sugere que contaminantes nas proximidades estejam sendo carregados até as nascentes, aumentando os danos causados pelas ações antrópicas.

Na análise de micronúcleo observaram-se danos mutagênicos e anomalias nucleares nas células nos peixes em todos os pontos estudados, indicando a presença de xenobióticos na água que causam danos ao DNA, podendo ser transmitida aos descendentes e comprometendo a sobrevivência dos organismos.

Já na análise de brânquias, não houve diferenças significativas nas análises do IAH entre os pontos durante o período chuvoso, indicando contaminação em todas as nascentes, porém houve diferença significativa entre os pontos durante o período seco, com uma maior contaminação no S2. Quando comparados entre o grupo controle com cada ponto durante os dois períodos, houve diferença significativa, indicando que há presença de agentes que danificam esse órgão dos peixes nos três pontos estudados durante os períodos chuvoso e seco.

Desta forma, as alterações histológicas, mutagênicas e anomalias nucleares, após os ensaios ecotoxicológicos utilizando a água das três nascentes da APA do Maracanã, em conjunto com os resultados das análises da água, indicam o comprometimento da sanidade destes peixes e da qualidade da água do local.

Estes dados podem auxiliar nos projetos de manejo implantados na área, uma vez que essa área deve ser utilizada de forma sustentável em consonância com a conservação dos recursos naturais ali existentes, sem comprometer a capacidade de suporte desse ambiente. Desta forma, como o manejo deve ter o propósito de proporcionar os meios e as condições para que todos os objetivos da unidade de conservação possam ser alcançados de forma

harmônica e eficaz, os resultados do trabalho podem subsidiar se tais objetivos estão sendo atingidos e promover meios para melhorar as medidas utilizadas na preservação.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M; SHUGART, L. R; SOUTHWORTH, G. R; HINTON, D.E. **Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress.** In McCarthy, J. F. and Shugart, L. R., Ed. Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton: Lewis Publishers. cap.19, p. 333-353, 1990.

AKCHA, F.; HUBERT, F. V.; PFHOL-LESZKOWICZ, A. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research**, v. 534, n. 1–2, p. 21– 32, 2003.

ALBA-TERCEDOR J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. IV SIAGA, **Almeria**, v. 2, p. 203-213, 1996.

ALVES, A. A. S.; GOMES, É. R. **Impacto ambiental e qualidade de água das nascentes do rio Caldeirão, Pedro II - Piauí.** In: 2º Conferência da REDE de Língua Portuguesa de Avaliação de Impactos e 1º Congresso Brasileiro de Avaliação de Impacto, São Paulo, 2012.

ANDRADE V. M.; SILVA J.; SILVA F. R.; HEUSER V.; DIAS J.; YONEAMA M.L; FREITAS T. R. O. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. **Environ Mol Mutagen** v.44, p.459–468, 2004.

ARCOVA, F.C.S; CICCIO, V. Características do deflúvio de duas microbacias hidrográficas no Laboratório de Hidrologia Florestal Walter Emmerich, Cunha-SP. **Revista Instituto Florestal de São Paulo**, v.9, n.2, p.153-170,1997.

AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 817-834, 2004.

AUGUSTO, C.; SILVA, R.; SANTOS, A. R. Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição. Universidade Santa Cecília. **UNISANTA**, Santos, SP, 1997.

AYAS, Z.; EKMEKCI, G.; OZMEN, M.; YERLI, S. V. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Tukey. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 242-249, 2007.

BARRETO, T.R. **Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrixã, Brycon cephalus (GUNTHER, 1869) exposto ao organofosfoado metil parathion (Folisuoer 600 Br ®).** 2007. 105f. Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências Fisiológicas). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

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, 2 ed. EPA 841-B-99002. U.S. **Environmental Protection Agency**; Office of Water; Washington, D.C, 1999.

BERNET, D.; SCHIMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHRADT-HOLM, WHALI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal Fishery Diseases**, n. 22, p. 25-34, 1999.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.

BOMBAIL V.; DENNIS A.; GORDON E.; BATTY J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, **Scotland**. *Chemosphere*, v.44, p.383–392, 2001.

BORRELY, S. I. **Avaliação da redução da toxicidade de efluentes tratados por irradiação com feixe de elétrons, por meio de testes de toxicidade aguda.** 2001. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - USP, São Paulo.

BRANCO, S. M.; AZEVEDO, S.M.F.O.; TUNDISI, J. G. Água e saúde humana. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação.** 3 ed. São Paulo, Escrituras Editora, 2007. 748p.

BRASIL, 1991. DECRETO 12.103 DE 01 DE OUTUBRO DE 1991. Criação da Área de Proteção Ambiental da Região do Maracanã, com limites que especifica.

BRASIL, 2003. **PLANO NACIONAL DE RECURSOS HÍDRICOS DOCUMENTO BASE DE REFERÊNCIA - MINUTA ÍNDICE,** 2003.

BRASIL. 1965. **Código Florestal** – Lei 4.771, de 15 de setembro de 1965, revogada pela Lei 12.651, de 25 de maio de 2012. Disponível em: em: <[http://www.planalto.gov.br/ccvil\\_03/Leis/L4771.htm](http://www.planalto.gov.br/ccvil_03/Leis/L4771.htm)>. Acesso em 28 jan. 2017



BRASIL. 1997. **Lei 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 9 jan 1997. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L9433.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9433.htm)>. Acesso em: 29 out. 2016. BRASIL, **Lei Federal nº 12.651 de maio de 2012**, p. 6.

BRASIL. **Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o artigo 222 § 1º, incisos I, II, III, VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação - SNUC.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 de jul. 2000.

BRASIL. 2002. **RESOLUÇÃO Nº 303, DE 20 DE MARÇO DE 2002.** Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de Áreas de Preservação Permanente. O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA, Disponível em: em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res02/res30302.html> >. Acesso em 28 mai. 2017

BRESEGHELO, L. *et al.* **Efeitos do fl uoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (Poecilia vivipara).** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, n. 4, p. 274-280, 2004.

BROWN, G.W. **Forestry and water quality.** 2 nd ed. Oregon: [s.n.], 1988. 142 p.

BUCKER, A.; CARVALHO, M. S.; CONCEIÇÃO, M. B.; ALVES-GOMES, J. A. Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 7, n.1, p. 65-73, 2012.

BURATINI, S.V.; BRANDELLI, A. **BIOACUMULAÇÃO.** In: *Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações.* Zagatto P. A & Bertoletti, E.(eds). São Carlos: Rima. 2006. 478p.

CALLISTO, M., MORETTI, M., GOULART, M. D. C. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 6, n., p.71-82, 2001.

CALHEIROS, R. O. *et al.* **Preservação e recuperação de nascentes.** Comitê de Bacias Hidrográficas. Piracicaba, 2004.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n.3, p. 327-336, 2007.

CAMPOS, G. A. **Mapa da Área de Proteção Ambiental do Maracanã, como destaque para as nascentes estudadas**, 2017.

CARROLA, J.; SANTOS, N.; ROCHA, M. J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; PARDAL, M. A.; MONTEIRO, R. A. F. M.; ROCHA, E. Frequency of micronuclei and of other nuclear anomalies in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego Douro and Ave estuaries – Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n.9, p. 6057-6068, 2014.

CARRASCO, K.R., TILBURY, K.L., MYERS, M.S. An assessment of piscine micronucleus test as an in-situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p. 2723-2136, 1990.

CARVALHO NETA, R.N.F.; FARIAS FILHO, M.S. **Fauna de Vertebrados da Área de Proteção Ambiental do Maracanã, São Luís- MA**. In: FORTES, R. (Org.). Área de Proteção Ambiental do Maracanã: Subsídios ao manejo e à Educação Ambiental. São Luís: FAPEMA, Café & Lápis, p. 52- 60, 2010.

CARVALHO-NETA, R. N. F. **Área de Proteção Ambiental do Maracanã: subsídios ao manejo e à Educação Ambiental**. Café & Lápis/ FAPEMA, São Luís, 2010.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES-JR, A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in Catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, p. 1314– 1327, 2012.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. **Brazil. Lat Am J Aquat Res**, v. 41, p.217– 225, 2013.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES, A. R. J. R.; SILVA D., CORTEZ, C. M. A simple mathematical model based on biomarkers in stress-resistant catfish species, *sciades herzbergii* (Pisces, ariidae), in São Marcos Bay, Brazil. **Appl Biochem Biotechnol** v. 174, p. 2380– 2391, 2014.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; SOUSA, D. B. P.; SOBRINHO, I. C. DE M.; HORTON, E. Y.; ALMEIDA, Z. DA S.; TCHAICKA, L.; Sousa, A. L. Genotoxic and hematological parameters in *Colossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brazil. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, n. 20, p. 15994-6003, 2015.

CHASIN, A.A.M.; AZEVEDO, F.A. **Intoxicação e avaliação da toxicidade**. In : F.A. Azevedo; A.A.M. CHASIN (eds.), *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. Rima, São Paulo, São Carlos. 2003.

COELHO, Ricardo dos Santos. **Avaliação da toxicidade de fluidos de Usinagem através da ecotoxicologia aquática**. São Carlos, 2006. Tese (Doutorado) -Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente**. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Brasília: Diário Oficial da União, 2002.

CONCEA, 2008. EBOOK: **Guia de manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino a pesquisa científica, fascículo 12**. In [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0238/238411.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238411.pdf). Acesso em 23/12/2016.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução Normativa n ° 357, de 17 de Março. 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**. Brasília, 2005

COSTA, P. M.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTIN, M.; FERREIRA, A. M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T. A.; COSTA, M. H. Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n.1, p. 55-65, 2011.

COSTA, P. M.; DINIZ, M.S.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTIN, M.; FERREIRA, A. M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T. A.; COSTA, M. H. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n.3, p. 202-212, 2009

DE AZEVEDO F. A, CHASIN A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, São Paulo: Intertox, 2004

DECAPRIO, AP. Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. **Environ. Sci. Technol.**, v.31, n. 7, 1837–1848, 1997.

DIAS, L. M. S. **Unidades de Conservação Estaduais em São Luís(MA)**. Disponível em: <luisjorgedias.blogspot.com.br>. Acesso em 23 de Novembro de 2017.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLLETTI, E. **Seleção, cultivo e manutenção de organismos aquáticos**. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (eds). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos RiMa editora. p. 153 – 184, Cap. 7. 2006.

DONADIO, N. M. M., GALBIATTI, J. A., DE PAULA R. C. QUALIDADE DA ÁGUA DE NASCENTES COM DIFERENTES USOS DO SOLO NA BACIA HIDROGRÁFICA DO CÓRREGO RICO, SÃO PAULO, BRASIL. **Eng. Agríc., Jaboticabal**, v.25, n.1, p.115-125, jan./abr. 2005.

DUFFUS, J. H., **Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC recommendations, 1993)**. Chemistry Division Commission on Toxicology, v. 65, n. 9, p. 2003-2122, 1993.

FARIA, A. P. (1997) A dinâmica de nascentes e a influência sobre os fluxos nos canais. **A Água em Revista (CPRM)**. v.8 pp. 74-80.

FARIAS FILHO, M. S. **Caracterização geoambiental da Área de Proteção Ambiental da Região do Maracanã, São Luís – MA**. In: CARVALHO NETA, R. N. F. *Área de Proteção Ambiental do Maracanã: subsídios ao manejo e à Educação Ambiental*. São Luís: FAPEMA, Café & Lápis, 2010. 15 – 39 p.

FAY, E. F. **Índice do uso sustentável da água (ISA-ÁGUA) na região do submédio São Francisco**. Jaguariúna: EMBRAPA, Meio Ambiente, 2006. 157p.

FELIPPE, M. F.; MAGALHÃES-JUNIOR, A. P. Impactos ambientais macroscópicos e qualidade das águas em nascentes de parques municipais em Belo Horizonte-MG. **Geografias- Artigos Científicos**, Belo Horizonte, v. 8, n. 2, p. 08-23 julho-dezembro de 2012.

FERNANDES, A.F. The use of biomarks in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.12, p.67-86, 2005.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. D. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genet Mol Biol**, v. 27, p.103–107, 2004.

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

FERREIRA, C.M. **Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática.** In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela, p.273-284, 2004.

FIORUCCI, A.R.; BENEDETTI-FILHO, E. **A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos.** Química Nova na Escola, n. 22, p. 10-16, 2005.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. **Necrosis, apoptosis, cytoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured assay: description of the method and results for hydrogen peroxide.** *Mutagen.* v.14, n. 6, p. 605-612, 1999.

FERGUSON, H. W. Systemic pathology of fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. **Ames**, Iowa State University Press, 1989.

FREIRE, M. M. et al., Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecol. bras.** v. 12, n.3, p. 347-354, 2008.

GAGNON, M. M.; BAKHTYAR, S. **Induction of fish biomarkers by synthetic-based drilling muds.** *PLoS Biol* 8:e69489. doi:10.1371/ journal.pone.0069489, 2013.

GALLI, C. C.; ABE, D.S. **Disponibilidade, Poluição e Eutrofização das Águas.** In: BICUDO, C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUEWSTUHL, M. C. B. (orgs.). Águas do Brasil: análises estratégicas, p. 165-178, 2010.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. **Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas.** In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental.* Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

GOMES, P. M.; MELO, C. VALE, V.S. Avaliação dos impactos ambientais em Nascentes na cidade de Uberlândia – MG: análise macroscópica. **Revisa sociedade e natureza.** Uberlândia, v.17, n.32, p. 103 – 120, jun. 2005<sup>a</sup>

GLEICK, P. H. **The world's water. 2000-2001.** Report on Freshwater Resources. Island Press, 2000. 315p

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM- Faculdade de Pará de Minas**, ano 2, n. 1, 2003.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**. n. 518, p. 145-150, 2002.

GROSELL, M., WOOD, C.M., Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **J. Exp. Biol.** v.205, p. 1179-1188, 2002.

GUO S. **Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?** *Genes Brain Behav* v. 3, p. 63–74, 2004.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973.

HILL A. J, TERAOKA H., HEIDEMAN W., Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol Sci.** v. 86,p. 6–19, 2005.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R. et al. **Histopathology biomarkers.** In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE Jr., P.M. et al. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. Florida: Lewis, p.155-209, 1992.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio. **Rev. Oecol. Brasil.**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

JOHNSON, L. L., STEHR, C. M., OLSON, O. P., MYERS, M. S., PIERCE, S. M., WIGREN, C. A., MCCAIN, B. B., VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Environmental Science and Technology**, v.27, n.13, p. 2759-2771, 1993.

KLAASSEN C. D. **Metais pesados e antagonistas dos metais pesados.** In: **Goodman, Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro: Mc Graw Hill. p. 1389-1407, 2001.

KAMER, I.; RINKEVICH, B. In vitro application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n. 2, p. 177-184, 2002.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, v. 498, p. 61-77, 2001.

KLONTZ, G.W. **Hematological techniques and the immune response in rainbow trout.** Symp. Zool. Soc. Lond., v.30, p.89-99, 1972.

LAWRENCE, C. **The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review.** **Aquaculture**, v. 269, p. 1-20, 2007.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

LEONARDI, M.; TARIFEÑO, E. VERA, J. Diseases of the Chilean flounder, *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867), as a biomarker of marine coastal pollution near the Itata River (Chile): Part II. **Histopathological lesion.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 56, p. 546-556, 2009.

LIAO, PO-SHIANG. D. L.; BEZERRA, J. M.; BASOSI, O. C.; BARRETO, M. C. Análise dos indicadores bacterianos de poluição dos rios Anil e Bacanga, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. **Rev. Saúde Pública [online]**, v.18, n.4, p. 278-287, 1984.

LICHTENFELS, A. J. F. C.; LORENZI-FILHO, G.; GUIMARAES, E. T.; MACCHIONE, M.; SALDIVA, P. H. N. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **Journal of comparative pathology**, v.115, n. 1, p. 47-60. 1996.

LINS, R.D.A.U. *et al.* **Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo.** An. Bras Dermatol. v. 85, n. 6, p. 849-55, 2010.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; CALASI, A.; GIORDANO, M.E.; SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. **BioMedical Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 57, p. 195–211, 1993.

LOPES-POLEZA, S. D. C. **Avaliação do efeito do metilmercúrio (CHHg<sup>+</sup>) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo**. 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LUNA, L. G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York : McGraw Hill, 1968. 258 p.

LUPI, C; NHACARINI, N.L; MAZON, A.F; SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro - SP. **Revista Fafibe on line.**, n. 3, 2007.

LUVIZOTTO, M. F. **Efeitos de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio branquial do peixe antártico *Nototheniops nudifrons* (Lonberg,1906)**. Dissertação (Programa de pós- graduação- Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 1994.

MACÊDO, L.A.A. **Qualidade ambiental dos rios da Ilha de São Luís**. São Luís; UFMA, 2003. 76p.

MACEDO, L. A. A. **Gestão das águas do Maranhão**. UNICEUMA - Centro Universitário do Maranhão, São Luís. p. 165. 2005.

MAGALHÃES, D.P; FERRÃO-FILHO, A.S. Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de ecossistemas Aquáticos. **Revista Oecol, Bras.** v. 12, n. 3, p.355-381, 2008.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. P. **Indicadores ambientais e recursos hídricos: realidade e perspectivas para o Brasil a partir da experiência francesa**. Bertrand Brasil. Rio de Janeiro, 2007.



MARTINS, A. G. L. de. A. **Efeitos da emissão dos efluentes domésticos na proliferação de *Aeromonas* sp. Em águas de superfície e pescado do estuário do rio Bacanga, São Luís/MA.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

MALINS, D. C. The use of environmental assays for impact assessment. **Hydrobiologia**, v. 188/189, p. 87-91, 1989.

MARANHÃO. Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão. **Sistema de localidade.** São Luís, 2009.

MARANHÃO, **Secretaria de Meio ambiente e Recursos Hídricos-SEMA,** São Luís, 2012.

MASSARO, Fernanda Cristina. **Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria: Hydrozoa).** São Carlos, 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) -Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

MATSUMOTO, S. T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP. 2004. 216 f.** Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

MCCARTY, L. S.; MUNKITTRICK, K. R. **Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional?** Hum Ecol Risk Assess, v. 2, n. 2, p. 268-274, 1996.

MCGLASHAN, D. J.; HUGHIES, J. M. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range. **Journal of Fish Biology**, v. 59, p. 55-67, 2001.

MEYERS, T.R; HENDRICKS, J.D. Histopathology. In: RAND G.M.; PETROCELLI, S.R. (Ed.) **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.** Washington, D.C.: Hemisphere Publishing Corporation. p. 283-331. 1985.

MIRANDA, A. L. C. de. **Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POPs) em traíra (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos in vitro em células do sistema imune de carpa (*Cyprinus caprio*).** 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MÍDIO, A. MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos.** São Paulo:Varela, 2000, 295p.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei,Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in fresh water. **Mutation Research**, v. 367, p. 245-251, 1996.

MONSERRAT, J.M. *et al.* **Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. v.146, p. 221–234, 2007.

MONSERRAT, J.M. GERACITRANO, L.A.; BIANCHINI, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. **Commentson Toxicology**. v. 9, p. 255- 269, 2003.

MORMUL, R. P.; KWIATKOWSKI, A.; ZERBINI, D. L. N.; FREITAS, A. A; ALMEIDA, A. C. G. Avaliação da qualidade da água em nascentes da favela São Francisco de Campo Mourão/PR. **Rev. Saúde e Biol.** v.1, n.1, p. 36-41, 2006.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B.Q. **Degradação de Recursos Hídricos e seus Efeitos Sobre a Saúde Humana.** Revista de Saúde Pública, v. 36, p. 370-374, 2002.

MORAES, G. de O., **O CONSTITUCIONALISMO ECOCÊNTRICO NA AMÉRICA LATINA, O BEM VIVER E A NOVA VISÃO DAS ÁGUAS.** R. Fac. Dir., Fortaleza, v. 34, n. 1, p. 123-155, jan./jun. 2013.

MORMUL, R. P.; KWIATKOWSKI, A.; ZERBINI, D. L. N.; FREITAS, A. A.; ALMEIDA, A. C. G. Avaliação da qualidade da água em nascentes da favela São Francisco de Campo Mourão/PR. SaBios: **Rev. Saúde e Biol.**, Campo Mourão, v. 1, n.1, p. 36-41. 2006.

MOURA, A. C.; ASSUMPÇÃO, R. A. B.; BISCHOFF, J. **Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006.** Arquivos do Instituto Biológico. v. 76, n. 1, p. 17-22, 2009.

NATARO J. P.; KAPER, J. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 142-201, 1998.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO; S. C.; SÁ, O. R. Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas - MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus* (LACÈPÈDE, 1803) como biomarcador de poluição ambiental. **Rev. Bras. Zoocienc.**, v.11, n. 1, p.227-232, 2008.

ODUM, E. P. **Ecologia**. 22 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1988.

OECD. Organisation for economic co-operation and development environment. Health and Safety Division. **Revised draft oecd guideline for the testing of chemicals: The Fish Screening Assay for Endocrine Active Substance**, Paris, 2008.

OHE, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutat. Res.** 567, 109–149, 2004.

OLIVEIRA, M. M. **Potencial da Acetilcolinesterase cerebral de peixes marinhos como biomarcadora de exposição a pesticidas**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2000.

OLIVEIRA, M. A. T.; HERRMANN, M. L. de P. **Ocupação do solo e riscos ambientais na área conurbana de Florianópolis**. In: GUERRA, Antonio José Teixeira e CUNHA, Sandra Baptista (orgs). **Impactos Ambientais Urbanos no Brasil**. 3ªed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, p. 147-188, 2005.

OLIVEIRA, M. S; FARIAS- FILHO, M. S. **USO DO SOLO, INDUSTRIALIZAÇÃO E CONSEQUENTE URBANIZAÇÃO NA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO MARACANÃ, SÃO LUÍS/MA**. São 10 Luís-MA-Brasil. Anais do SINGA (Simpósio Internacional e Nacional em Geografia Agrária). Belém: UFPA, 2011.

OSSANA, N. A.; EISSA, B. L.; SALIBIAN, A. Cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Internation Journal of Environmental and Health**, v. 3, p. 302-309, 2009.

PEREIRA, V.P. **Solo: manejo e controle de erosão hídrica**. Jaboticabal: FCAV, 1997. 56 p

PEREIRA, D. P.; SANTOS, D. M. S.; CARVALHO NETA, A. V.; CRUZ, C. F.; CARVALHO NETA, R. N. F. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na Laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, p. 1213-1221, 2014.

PEREIRA, D. N.; GOLDSTEIN, E.G.; ZAGATTO, P.A.; SASSI, R. Bioensaios: um programa a serviço do controle de poluição. Resultados Iniciais. **Revista Ambiente**, v.1, n.1, p.32-36, 1987.

PINHEIRO-SOUSA, D. B; OLIVEIRA, S. R. S.; SODRÉ, C. F. L.; CASTRO, J. da S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores Hematológicos e Genotóxicos em Peixes da Área de Proteção Ambiental do Maracanã, São Luís-MA. **Áreas e proteção Ambiental no Maranhão: Situação Atual e Estratégias de Manejo**. 360º Gráfica e Editora, São Luís, 2015.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes), to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 305-312, 2013.

POLEKSIC V, MITROVIC-TUTUNDZIC V. 1994. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution**. In: Müller, R. & Lloyd, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books. p 339–352, 1994.

POLARD, T., JEAN, S., MERLINA, G., LAPLANCHE, C., PINELLI, E. & GAUTHIER, L. 2011. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74: 144-149.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292, 2005.

RASHED, M. N. **Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake**. **Environment International**, v. 27, n. 1, p. 27-33, 2001.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1148p. 1995

RAND, G.M. & S.R. PETROCELLI. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Taylor & Francis. 666 p.1985.

RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **O Uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar em Porto Alegre**. In: ZURITA, M. L. L.; TOLFO, A.M. (Org.) *A Qualidade do Ar em Porto Alegre*. Porto Alegre, Secretaria Municipal do Meio Ambiente. p.68-76, 2000.

REBOUÇAS, A. C. "**Águas subterrâneas**", cap. 4. p. 119-151, in Rebouças, A. C., Braga, B. & Tundisi, J.G. *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*, 703 p. 2. Edição revisada e ampliada, São Paulo, 2002.

REBOUCAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas Doces no Brasil: Capital Ecológico, Uso e Conservação**. 3. ed. São Paulo - SP: Escrituras Editora,748p, 2006.

RIBO, J. M. **Environ. Toxicol.** Water Qual.v. 12, p. 263. 1997.

RIBEIRO, L. R. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

ROGERS, P. P. **Water governance, water security and water sustainability**. In: RoGeRs, P. P. et al. (ed.) *Water crisis: myth or reality?* London: Fundación Marcelino Botín, taylor & Francis, p. 3-36, 2006.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. **Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**; Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1. 2004.

ROCHA, P. C. **Os processos geomórficos e o estado de equilíbrio fluvial no alto rio Paraná, centro-sul do Brasil**. *Geosul (UFSC)*, v. 24, p. 153-176, 2009.

RUBINSTEIN AL. **Zebrafish: from disease modeling to drug discovery**. *Curr Opin Drug Discov Dev*. v. 6, p. 218-223, 2003.

RÜDIGER HW. **Biomonitoring in occupational medicine**. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). *Toxicology*. San Diego: Academic Press. p. 1027-39, 1999.

SANTOS, D. M. S.; MELO, M. R. S.; MENDES, D. C. S.; ROCHA, I. K. B. S.; SILVA, J. P. L.; CANTANHÊDE, M. C.; MELETTI, P. C. **Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil)**. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 11, p. 12927-12937, 2014.

SANTOS, S.R; SANTOS, P. C., **GESTÃO SOCIOAMBIENTAL NA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO MARACANÃ EM SÃO LUÍS (MA)** .VIII ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ECOLÓGICA 5 a 7 de agosto de 2009 Cuiabá - Mato Grosso – Brasil. 2009.

SANTOS, S. R. dos; SANTOS, P. C. dos. **Área de Proteção Ambiental do Maracanã em São Luís (Maranhão, Brasil): aspectos socioambientais e o desenvolvimento local na atividade turística**. *Turismo & Sociedade*, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 71-90, abril de 2011.

SCHIMID, W. **The micronucleus test for cytogenetics analysis**. In: **Principles and Methods for Their Detection (Hollanender, A., ed.)**. Plenum Press, New York, v. 4, p. 31-53, 1975.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações Agudas**, São Paulo, Savier, 1991, 355p.

SCHWAIGER, J.; R. WANKE, S.; ADAM, M. PAWERT; W. HONNEN.; R. TRIEBSKORN. The use of histopatological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v.6, p.75-86, 1997.

SERIANI, R.; ABESSA, D.; KIRSCHBAUM, A. A.; PEREIRA, C. D. S.; RANZANIPAIVA, M. J. T.; ASSUNÇÃO, A.; SILVEIRA, F. L.; ROMANO, P.; MUCCI, J. L. N. Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarker in the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n.2, 2012.

SERIANI, R.; ABESSA, D.; MOREIRA, L. B.; CABRERA, J. P.; SANCHES, J. Q.; SILVA, C. L.; CARVALHO-OLIVEIRA, R. **In vitro mucus transportability, cytogenotoxicity, and hematological changes as non-destructive physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 112, p. 162-168, 2015.

SILVA, Iracy Xavier da. **Gestão das áreas de proteção ambiental – APAS – no estado de São Paulo: estudo e avaliação.** 2006. 199 pg. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SILVA, A. C de; NEPONUCENO, J. C. **Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba.** Perquirere. Patos de Minas: UNIPAM, v. 1. n.7, p.167-179, ago. 2010.

SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; TORRES, J. A.; AMORIM, M. T. P S. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo. **Químia Nova**, v. 35, n. 5, p.889-894, 2012.

SOARES, L. S. **Avaliação da aplicação do “Índice de Sustentabilidade de Bacias hidrográficas” como subsídio para formulação de Políticas Públicas de conservação nas sub-bacias dos rios Batatã e Maracanã, Ilha de São Luís – MA.** Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas). Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2010.

SOUSA, D. B. P.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes) to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão. Brazil. **Lat Am J Aquat Res**, v. 41, p.305–312, 2013.

SOUZA, T.S., FONTANELLI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents. **Mutation Research**, v.605, p.87-93, 2006.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.**, v.6, p.75-86, 1997.

STEPHAN, C. E.; MOUNT, D. I. **Use of toxicity tests with fish in water pollution control**, p. 164-175, 1973. In: *Biological Methods for the Assessment of Water Quality*, ASTM International, STP 528. American Society Testing and Materials. Philadelphia, Pa., 254 p., 1973.

STRAŠKRABA, M. & TUNDISI, J.G. (orgs). **Diretrizes para o gerenciamento de lagos: gerenciamento da qualidade da água de represas.** 2ª ed. Instituto Internacional de Ecologia, São Carlos, vol.9, 300 p, 2008.

TRABULSI L. R. *et al.* **Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, p. 508-513, 2002.

TUNDISI, J.E.M. **Indicadores da qualidade da bacia hidrográfica para gestão integrada dos recursos hídricos: estudo de caso: bacia hidrográfica do médio Tocantins (TO).** Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos, 2006. 152 p.

TUNDISI, J. G. **Água no Século XXI: Enfrentando a Escassez.** 2 ed. Editora: RiMa. São Carlos, 2005.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; SIDAGIS GALLI, C. (Ed.). **Eutrofização na América do Sul: causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle. IIE, IIEGA, ABC, IAP,** Ianas, 2006. p.161-82.

UDROIU, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79: 201-204

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

VAN DER OOST, R., Goksaryr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulend, N. P. E. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology*, v. 36, p. 189-222, 1996.

VAN DYK, J.C. **Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation.** 2005. 47f. Tese (Doutorado) - University of Johannesburg, Johannesburg, South Africa. 2005.

VASCONCELOS, J. R. de. **Maracanã para todos: uma proposta de desenvolvimento sustentável para a Área de Proteção Ambiental da Região do Maracanã.** UEMA/ CTDS. São Luís, 1995.

VICARI, T. **AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO DE DUAS CONCENTRAÇÕES (0,075µg/g E 0,75 µg/g) DO METILMERCÚRIO EM. *Hoplias malabaricus* (PISCES) ATRAVÉS DOS ENSAIOS COMETA E MICRONÚCLEO.** Brasil. Universidade Federal do Paraná-UFPR, 2009.



VINHOTE, H. C. A. **Sustentabilidade das Formas de Ocupação, Usos e Conservação das Matas Ciliares nas Nascentes do Rio Bacanga, São Luís – MA.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas – UFMA. 2008.

WALKER, J. A.; BOREHAM, D. R.; UNRAU, P.; DUCAN, A. M. V. Chromosome content and ultrastructure of radiation – induced micronuclei. **Mutat. Res.** v. 11, n. 5, p. 419-424, 1996.

WALTERS, G. R; PLUMB, J. A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Biology**, London, v. 17, p. 177-185, 1980.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio).** Eugene. OR: University of Oregon, Institute of Neuroscience, 1994.

WILSON, J. M.; LAM, P. K. **Fish gill morphology: inside out.** **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p.192-213, 2002.

YASSER, A. G.; NASER, M. D. Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study. **Environmental monitoring and assessment**, v. 181, p. 175-182, 2011.