



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA
ANIMAL – CURSO DE MESTRADO

RILDON PORTO CANDEIRA

**BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS PARA MONITORAMENTO DA SANIDADE DE
DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS EM ÁREA LACUSTRE
MARANHENSE, BRASIL**

SÃO LUÍS

2022

RILDON PORTO CANDEIRA

**BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS PARA MONITORAMENTO DA SANIDADE DE
DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS EM ÁREA LACUSTRE
MARANHENSE, BRASIL**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal (Curso de Mestrado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), para a obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

SÃO LUÍS

2022

Candeira, Rildon Porto.

Biomarcadores histológicos para monitoramento da sanidade de duas espécies de peixes neotropicais em área lacustre maranhense, Brasil / Rildon Porto Candeira. – São Luís, 2022.

73 f

Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação em Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra.

1.Estressores. 2.Lesões. 3.Animais aquáticos. 4.Saúde animal. I.Título.

CDU: 639.2.053.3(812.1)

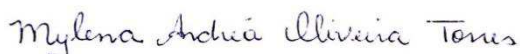
RILDON PORTO CANDEIRA

**BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS PARA MONITORAMENTO DA SANIDADE DE
DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS EM ÁREA LACUSTRE
MARANHENSE, BRASIL**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal (Curso de Mestrado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), para a obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.



Prof^ª. Dr^ª. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
Orientadora
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA



Prof^ª. Dr^ª. Mylena Andréa Oliveira Torres
1º Membro/Examinador Externo
Universidade Ceuma - UNICEUMA



Prof^ª. Dr^ª. Viviane Correa Silva Coimbra
2º Membro/Examinador Interno
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

SÃO LUÍS

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é meu tudo. Obrigado pela vida, por me permitir dormir e acordar todos os dias. És quem eu mais confio, estás comigo em todos os momentos, mesmo naqueles mais difíceis, em que nos sentimos fracos e achamos que não existe uma saída. Aí lembramos do seu amor, misericórdia e das oportunidades que já nos concedeste. Agradeço por chegar até aqui.

Aos meus pais Terezinha Porto e José Candeira. Faltam palavras para expressar a minha gratidão por tudo que já fizeram por mim. Obrigado pelo suporte e incentivo nesta trajetória.

As minhas irmãs Aline Porto e Madeline Porto, por todo apoio e encorajamento. Aos meus sobrinhos Guilherme, Gabriel, Daniel e Davi por fazerem mais feliz a minha vida.

A minha estimada orientadora Profa. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra por ter me acolhido tantas vezes. Agradeço por suas orientações, suporte e elogios, sempre de grande valia. Tens minha profunda admiração.

A equipe executora deste trabalho em nome de Ladilson Rodrigues, Greicine de Jesus, Izabela Paiva, Juliany Mendes, Vitória Monteiro e Professor Danilo Bezerra. A contribuição de cada um foi fundamental para a realização desta pesquisa. Obrigado por tudo.

Ao Programa de Pós Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal, em nome da coordenadora do curso, Profa. Viviane Correa Silva Coimbra, e a todo corpo docente. Meus profundos agradecimentos e pela compreensão de que a vida não é somente uma linha reta. Agradeço também à Maria da Conceição da Silva Nascimento, nossa secretária, pela disponibilidade e paciência ao longo dessa trajetória.

A minha grande amiga Raissa Brandão, pelo seu companheirismo, ajuda e por ter me acompanhado desde a graduação até aqui. Por todos os momentos que compartilhamos e situações que apenas nós sabemos. Levarei você comigo para sempre.

Aos demais amigos Alexandre Machado, Ana Carolina Muniz, Karlianne Pereira, Lia Silva, Sergio Costa e Thaynan Araújo, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

A todos amigos e colegas da minha turma de mestrado, cada momento compartilhado com vocês foi precioso. Obrigado pela possibilidade de aprender com cada um e pelo companheirismo nesta trajetória. Vocês são muito especiais.

A Profa. Ana Clara Gomes dos Santos pela compreensão e conselhos nos momentos de dificuldade.

A Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela concessão da bolsa e pela infraestrutura laboratorial utilizada.

E a todos que fizeram parte desta trajetória, os meus sinceros agradecimentos.

*“Eu me deitei e dormi; acordei,
porque o Senhor me sustentou.”*

Salmos 3:5

RESUMO

Os peixes são suscetíveis à ação de estressores ambientais (químicos, físicos e biológicos) que podem provocar efeitos negativos nessa classe de vertebrados. Nesses animais, alguns órgãos podem ser afetados, como as brânquias e o fígado, sendo a histologia uma importante ferramenta para a avaliação dos impactos causados nesses órgãos. Logo, objetivou-se com o estudo monitorar a sanidade de duas espécies de peixes neotropicais em área lacustre maranhense com a utilização de biomarcadores histológicos. Para isso, foram capturados 42 exemplares de peixes adultos, sendo 21 de *Hoplerythrinus unitaeniatus* e 21 de *Cichlasoma bimaculatum*, que foram transportados vivos em água de origem até ambiente laboratorial para eutanásia, remoção de fragmentos de brânquias e fígado e posterior análises histológicas no Laboratório Multiusuários da Pós-Graduação (LAMP) da UEMA. Logo após, os fragmentos dos órgãos foram submetidos às etapas de processamento histológico e, por fim, corados com hematoxilina - eosina (HE). As alterações histológicas branquiais e hepáticas foram avaliadas de forma semiquantitativa, por meio do cálculo do índice de alteração histológica (IAH), fundamentado na severidade de cada lesão da seguinte forma: (i) alterações de estágio I - não comprometem o funcionamento dos órgãos; (ii) estágio II - lesões mais severas e que prejudicam o funcionamento normal dos órgãos; e, (iii) estágio III - lesões muito severas e irreversíveis. Os resultados foram apresentados de forma conjunta para as duas espécies em que se constatou que as alterações branquiais mais frequentes foram fusão completa (85,71 %) e incompleta (85,71 %) de várias lamelas, levantamento do epitélio (80,95 %), congestão de vasos sanguíneos (76,19 %), desorganização das lamelas (76,19 %) e hiperplasia do epitélio lamelar (76,19 %), todas de estágio I. Alterações de estágio II (hemorragia e ruptura do epitélio lamelar, hiperplasia e hipertrofia das células de muco, hiperplasia e hipertrofia das células de cloro, fusão completa de todas as lamelas, espessamento descontrolado do tecido proliferativo, rompimento de células pilares) e III (necrose e degeneração celular e, aneurisma lamelar) também foram observadas, mas em menor frequência. As alterações hepáticas mais encontradas foram vacuolização (90,48 %), centro de melanomacrófagos (78,57 %), deformação do contorno celular (66,67 %) e núcleo na periferia da célula (52,38 %), alterações de estágio I e hiperemia (45,24 %) e degeneração citoplasmática (40,48 %), alterações de estágio II. Em menor percentual também foram observadas necrose (9,52 %), alteração de estágio III. Conclui-se que as duas espécies de peixes neotropicais avaliadas tiveram a sanidade comprometida, que pode ser resultado de interações com agentes estressores de diferentes naturezas, inclusive com lesões irreversíveis que possivelmente estavam comprometendo o funcionamento dos órgãos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: Estressores. Lesões. Animais aquáticos. Saúde animal.

ABSTRACT

Fish are susceptible to the action of environmental stressors (chemical, physical and biological) that can have negative effects on this class of vertebrates. In these animals, some organs can be affected, such as the gills and the liver, and histology is an important tool for the evaluation of the impacts caused in these organs. Therefore, the aim of the study was to monitor the health of two species of neotropical fish in a lake area in Maranhão with the use of histological biomarkers. For this, 42 specimens of adult fish were captured, 21 of *Hoplerythrinus unitaeniatus* and 21 of *Cichlasoma bimaculatum*, which were transported alive in source water to the laboratory for euthanasia, removal of gill and liver fragments and subsequent histological analysis in the Multiuser Laboratory. Graduate Program (LAMP) at UEMA. Right after, the organ fragments were submitted to histological processing steps and, finally, stained with hematoxylin - eosin (HE). Branchial and hepatic histological alterations were evaluated in a semi-quantitative mode, by calculating the histological alteration index (AHI), based on the severity of each lesion, as follows: (i) stage I alterations - they do not compromise organ function; (ii) stage II - more severe injuries that impair the normal functioning of the organs; and, (iii) stage III - very severe and irreversible injuries. The results were presented together for the two species in which it was found that the most frequent gill alterations were complete (85.71 %) and incomplete (85.71 %) fusion of several lamellae, lifting of the epithelium (80.95 %), blood vessel congestion (76.19 %), lamellar disorganization (76.19 %) and lamellar epithelium hyperplasia (76.19 %), all stage I. Stage II alterations (hemorrhage and rupture of the lamellar epithelium, mucus cell hyperplasia and hypertrophy, chlorine cell hyperplasia and hypertrophy, complete fusion of all lamellae, uncontrolled proliferative tissue thickening, pillar cell disruption) and III (cell necrosis and degeneration and, lamellar aneurysm) were also observed, but less frequently. The most frequent hepatic alterations were vacuolization (90.47 %), melanomacrophage center (78.57 %), cell contour deformation (66.67 %) and nucleus in the cell periphery (52.38 %), stage alterations I and hyperemia (45.24 %) and cytoplasmic degeneration (40.48 %), stage II alterations. In a lower percentage, necrosis (9.52 %), stage III alteration was also observed. It is concluded that the two species of neotropical fish evaluated had their sanity compromised, which may be the result of interactions with stressors of different natures, including irreversible injuries that were possibly compromising the functioning of the evaluated organs.

KEYWORDS: Stressors. Injuries. Aquatic animals. Animal health.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Biomarcadores utilizados em ambientes aquáticos.....	31
Tabela 2.	Principais espécies de peixes em ambientes lacustres da Baixada Maranhense.....	34

CAPÍTULO III

Table 1.	Classification of histological alterations observed in gill and liver samples, based on lesions' severity stage.....	50
Table 2.	Frequency of gill alterations observed in <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> and <i>Cichlasoma bimaculatum</i> specimens from a lake zone in Maranhão State	51
Table 3.	Frequency of liver lesions observed in <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> and <i>Cichlasoma bimaculatum</i> specimens from a lake zone in Maranhão State	54

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

- Figure 1.** Photomicrographs of gill alterations observed in *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum* specimens from a lake zone in Maranhão State. [A] Lamellar epithelium rupture (arrows), vasodilation and congestion (asterisks); [B] Secondary lamellae fusion and lamellar epithelial hyperplasia (arrows); [C] Lamellar aneurysm (asterisks) and epithelial lifting (arrow). HE staining. 40X objective lens..... 52
- Figure 2.** Photomicrographs of liver alterations observed in *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum* specimens from a lake zone in Maranhão State. [A] Melanomacrophage center (asterisk), vacuolization (arrows) and nucleus at cell periphery (arrowheads); [B] Necrotic areas in the liver parenchyma (arrows). HE staining. 40X objective lens..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChE	Acetilcolinesterase
AGED-MA	Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão
AGERP	Agência Estadual de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Maranhão
ALAD	Ácido Delta-aminolevulínico Desidratase
APA	Área de Proteção Ambiental
As	Arsênio
Cd	Cádmio
CEEa	Comitê de Ética em Experimentação Animal
Cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr	Crômio
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DBT	Dibutilestanho
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
G	Gramas
HE	Hematoxilina-eosina
Hg	Mercúrio
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IAH	Índice de Alteração Histológica
IFMA	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão
IMESC	Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos
IMO	Organização Internacional Marítima
LAMP	Laboratório Multiusuários da Pós-Graduação
LARAQUA	Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
NBR	Norma Brasileira
Pb	Chumbo
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de polivinila
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
SAF	Secretaria de Estado da Agricultura Familiar
SAGRIMA	Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Pesca
SENAR	Serviço Nacional de Aprendizagem Rural
TBT	Tributilestanho
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Justificativa e Importância do Trabalho	18
1.2 Objetivos.....	18
1.2.1 Geral	18
1.2.2 Específicos	19
1.3 Estrutura do Trabalho	19
Referências	19

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Contaminação em Ambientes Aquáticos.....	23
2.1.1 Metais pesados	24
2.1.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	25
2.1.3 Pesticidas organoclorados.....	26
2.1.4 Pesticidas organofosforados e carbamatos.....	27
2.1.5 Organoestanhos: tributilestanho (TBT) e dibutilestanho (DBT)	27
2.2 Biomonitoramento.....	28
2.3 Biomarcadores	30
2.4 Peixes como Bioindicadores de Qualidade Ambiental	32
2.5 Características do Ecossistema Lacustre da Baixada Maranhense.....	33
2.6 Caracterização do <i>Cichlasoma bimaculatum</i> e <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	34
REFERÊNCIAS	35

CAPÍTULO III

USING GILL AND LIVER BIOMARKERS TO MONITOR THE HEALTH OF TWO NEOTROPICAL FISH SPECIES IN A LAKE ZONE IN MARANHÃO STATE	45
ABSTRACT	45
RESUMO.....	46
INTRODUCTION	46
MATERIALS AND METHODS	48
Legal Authorization.....	48
Study Site.....	48
Fish sample collection.....	49
Laboratory Processing and Histological Analysis	49
RESULTS AND DISCUSSION	51

CONCLUSIONS.....57
REFERENCES 57

CAPÍTULO IV

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....63
ANEXO..... 65

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes representam grande parte dos animais vertebrados, com milhares de espécies conhecidas, assim sendo o grupo de maior diversidade dentre os vertebrados (MORO *et al.*, 2013). Na alimentação são altamente importantes e recomendados, pois são nutritivos e possuem altas quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D e minerais, além de serem ricos em proteínas e ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega 3 e 6 (SARTORI; AMANCIO, 2012).

A criação de peixes é praticada há muitos séculos e engloba diversas finalidades, tais como lazer, ornamentação, cultivo de subsistência, comercialização e experimentação científica (TEIXEIRA FILHO, 1991). Nas décadas de 1970 a 1990 a criação de peixes no Brasil passou por grandes avanços, impulsionados pelas transformações tecnológicas que viabilizaram o cultivo de peixes nativos, especialmente o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o curimatá (*Prochilodus lineatus*), e também pela rápida expansão no cultivo da tilápia (*Oreochromis niloticus*), acompanhada com a mudança da percepção dos consumidores em relação a esta espécie (KUBITZA *et al.*, 2007).

A produção de peixes acompanhou a evolução da cadeia agropecuária no Brasil. Além disso, o País possui boas condições para o desenvolvimento de atividades piscícolas, assim como recursos naturais favoráveis e um mercado amplo com perspectivas de crescimento (PIZAIA *et al.*, 2008; SEBRAE, 2014). Com a implantação e implementação de políticas públicas em âmbito nacional, o Brasil será capaz de se tornar um dos maiores produtores de peixes mundialmente (BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003).

Já a pesca é realizada desde a pré-história da humanidade e é definida pela Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009, como “toda operação, ação ou ato tendente a extrair, colher, apanhar, apreender ou capturar recursos pesqueiros” (BRASIL, 2009). Nesse âmbito, pode-se destacar a pesca artesanal, que é realizada em embarcações de pequeno porte, sem instrumentação de bordo (SANTOS *et al.*, 2012).

Nos ambientes lacustres com a presença de peixes, é necessário um monitoramento adequado, pois fatores como superlotação, mudanças climáticas e contaminações químicas podem facilitar que doenças apareçam e se disseminem nas populações, causando perdas econômicas (ONAKA, 2009). Além disso, Organização Mundial de Saúde (WHO) decretou em 2020 a pandemia de COVID-19, o que gerou incertezas no mundo todo (WHO, 2020). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a pesca e aqüicultura globais sofreram com os impactos da pandemia, principalmente nos países em

desenvolvimento e em especial para os pequenos produtores e comunidades que dependem do seu trabalho para sua subsistência (FAO, 2021).

O levantamento realizado pela Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR) corrobora com essas informações. Por meio de seu anuário lançado no presente ano, foi possível verificar que a produção brasileira cresceu abaixo do esperado no ano de 2021, tendo como um dos motivos as dificuldades impostas pela pandemia. No entanto, a produção de peixes no país continua avançando (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, 2022).

Tanto em ecossistemas naturais ou artificiais, os peixes estão expostos a condições que podem afetar a homeostase dos organismos, provocadas pelos denominados agentes estressores, que podem ser de origem química, biológica, física ou até mesmo serem relacionados ao manejo dos animais. A ação dos estressores pode provocar efeitos negativos na sanidade, crescimento, reprodução e sobrevivência desses organismos (VAL; SILVA; VAL, 2004).

Os animais afetados apresentam baixa na imunidade, ficando vulneráveis aos diversos estressores que podem provocar alterações microscópicas e macroscópicas em múltiplos órgãos, sendo a histologia uma das principais ferramentas para a observação e diagnóstico de lesões e enfermidades nesses indivíduos (CAVICHIOLO, 2009). Dessa forma, os peixes podem ser utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental (CHOVANEC; HOFER; SCHIEMER, 2003).

A qualidade do solo e, principalmente, da água dos ecossistemas aquáticos também tem grande influência nos animais que neles vivem, sendo o conhecimento sobre limnologia* muito importante para entender a dinâmica desses ambientes (SÁ, 2012). Em ecossistemas lacustres, como lagoas e campos que são alagados periodicamente, as concentrações de oxigênio dissolvido sofrem variações expressivas, o que torna esses ambientes sem condições de habitabilidade para diversas espécies de peixes em períodos de pouca chuva (PETRY; THOMAZ; ESTEVES, 2011).

Ademais, esses ecossistemas são passíveis de contaminações provocadas por efluentes oriundos de propriedades rurais (que incluem defensivos agrícolas e fertilizantes e são agravados pela lixiviação, enxurradas e erosões), resíduos domésticos não tratados e substâncias decorrentes de extração e mineração, representando um perigo à saúde humana,

***Limnologia:** ciência que estuda os ecossistemas continentais (lagos, rios, lagoas, riachos, represas, açudes, viveiros e tanques de piscicultura etc), nos seus aspectos físicos, químicos e biológicos de forma integrada, visando utilizar racionalmente esses reservatórios de água (SÁ, 2012).

animal e ambiental, constituintes da denominada Saúde Única (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2009).

1.1 Justificativa e Importância do Trabalho

O estado do Maranhão possui uma grande potencialidade para as atividades agropecuárias (SILVA *et al.*, 2020). Dentre elas é possível destacar a pesca e aquicultura e devido a importância de ambas para o desenvolvimento econômico e segurança alimentar, é um setor muito valorizado pelo governo do estado.

A região da Baixada Maranhense possui uma rica diversidade ecológica e importância social para o Maranhão. As áreas nela presente são de estruturas complexas, constituídos de campos alagáveis, lagos marginais e outros sistemas lacustres, que possibilitam a pesca e a criação de peixes, sendo essas atividades uma das principais fontes de subsistência das famílias que residem nessa região (LAFONTAINE; LAFONTAINE, 2009).

De Jesus *et al.* (2022) observou a depreciação ambiental da qualidade da água nos ambientes lacustres da Baixada Maranhense e destacou a existência de inúmeros impactos ambientais no estado do Maranhão. Sendo assim, esses ecossistemas e suas biotas necessitam de uma atenção especial, logo, um trabalho que consiga avaliar a sanidade das espécies de peixes presentes nessa área é importante não somente para o conhecimento da saúde dos espécimes e das possíveis perdas econômicas, mas também para a saúde humana, tendo a vista a possibilidade zoonótica de enfermidades.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

- Monitorar a sanidade de duas espécies de peixes neotropicais em área lacustre maranhense com a utilização de biomarcadores histológicos.

1.2.2 Específicos

- Identificar e quantificar as alterações branquiais e hepáticas em *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Cichlasoma bimaculatum* de uma área lacustre, Maranhão.
- Classificar as alterações histológicas branquiais e hepáticas encontradas quanto ao grau de severidade das lesões.
- Relacionar a sanidade das duas espécies de peixes neotropicais a possíveis impactos ambientais.

1.3 Estrutura do Trabalho

Este Trabalho de Dissertação encontra-se estruturado em quatro (04) capítulos:

- **Capítulo I:** refere-se à introdução geral do trabalho, em que está incluída a justificativa e importância do estudo, além dos objetivos geral e específicos.
- **Capítulo II:** encontra-se a revisão de literatura do trabalho.
- **Capítulo III:** é apresentado o artigo intitulado “*Using gill and liver biomarkers to monitor the health of two neotropical fish species in a lake zone in Maranhão state*” adequado às normas da Revista Acta Veterinaria Brasilica, ISSN 1981-5484 *versão online* (normas do periódico em Anexo 1). Esse periódico está classificado no *Qualis* Capes B2 – *Qualis* único 2019.
- **Capítulo IV:** encontram-se as considerações finais do trabalho.

Referências¹

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário 2022**. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario2022>. Acesso em: 20 ago. 2022.

BRASIL. Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009. Dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, revoga a Lei nº 7.679, de 23 de novembro de 1988, e dispositivos do Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa**

¹Capítulo formatado de acordo com as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Normas Brasileiras (NBRs) 105520/2002 (citações), 14724/2011 (trabalhos acadêmicos), 6023/2018 (referências).

do Brasil, Brasília, DF, 30 de junho de 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Lei/L11959.htm. Acesso em: 20 ago. 2022.

BORGHETTI, N. R.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128 p.

CAVICHIOLO, F. Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. (org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 602-624.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (ed.). **Bioindicators and Biomonitors**. [S.L.]: Elsevier, 2003. p. 639-676. doi:10.1016/s0927-5215(03)80148-0.

DE JESUS, G. dos S. *et al.* Qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais utilizadas para fins de pesca artesanal em Comunidade Quilombola Maranhense. In: CASTRO, A. C.; CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. V. (Org.). **Meio ambiente e a outra economia dos povos e comunidades tradicionais**. Guarujá: Científica Digital, 2022. p. 61-72. doi: 10.37885/220207927

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Pesca e aquicultura global foram duramente atingidas pela pandemia de COVID-19, diz relatório da FAO**. 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1373383/>. Acesso em: 02 set. 2022.

KUBITZA, F.; ONO, E. A.; CAMPOS, J. L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: Uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 102, p. 14-23, jul. 2007.

LAFONTAINE, L. C.; LAFONTAINE, T. C. Campos inundáveis do rio Pericumã no entorno da cidade de Pinheiro: uma beleza ameaçada pela dinâmica das comunidades rurais. In: IV Jornada Internacional de Políticas Públicas, 2009, São Luís. **Anais [...]**. São Luís: Ufma, 2009. p. 1-8. Disponível em: http://www.joinpp.ufma.br/jornadas/joinppIV/eixos/8_agricultura/campos-inundaveis-do-rio-pericumã-no-entorno-da-cidade-de-pinheiro-uma-beleza-ameacada-pela-din.pdf. Acesso em: 20 ago. 2022.

MORO, G. V. *et al.* **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 440p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1082280>. Acesso em: 15 ago. 2022.

ONAKA, E. M. Principais parasitoses em peixes de água doce no Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (org.). **Manejo e Sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Macapá, 2009. p. 536-574.

PETRY, A. C.; THOMAZ, S. M.; ESTEVES, F. de A. Comunidade de peixes. *In*: ESTEVES, F. de A. (org.). **Fundamentos da limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. p. 609-624.

PIZAIA, M. G. *et al.* **A piscicultura no Brasil: um estudo sobre a produção e comercialização de “*Oreochromis niloticus*”**. *In*: XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, Rio Branco: Sober, 2008. p. 1-16. doi: 10.22004/ag.econ.109999

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 256 p.

SÁ, M. V. C. **Limnocultura**: limnologia para aquicultura. Fortaleza: Edições Ufc, 2012. 218 p.

SANTOS, M. P. N. dos. *et al.* A Pesca enquanto Atividade Humana: pesca artesanal e sustentabilidade. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, Lisboa, v. 12, n. 4, p. 405-427, dez. 2012.

SARTORI, A. G. de O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.19, n. 2, p. 83-93, fev. 2012. doi:10.20396/san.v19i2.8634613.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **A evolução da Piscicultura no Brasil**. 2014. Disponível em: <https://respostas.sebrae.com.br/a-evolucao-da-piscicultura-no-brasil>. Acesso em: 17 ago. 2021.

SILVA, A. R. de A. **AGROINDUSTRIALIZAÇÃO DE FRANGO CAIPIRA, MEL E PEIXE NO ESTADO DO MARANHÃO**: caracterização socioeconômica dos agricultores familiares e elaboração de perfil simplificado de planta baixa. 2020. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2020.

TEIXEIRA FILHO, A.R. **Piscicultura ao alcance de todos**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 1991. 212 p.

VAL, A. L.; SILVA, M. de N. P. da; VAL, V. M. F. de A. e. Estresse em peixes - ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. *In*: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. de los A. P. (org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. p. 51-74.

WHO. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>. Acesso em: 01 set. 2022

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação em Ambientes Aquáticos

A água é a substância mais abundante no planeta, sendo responsável pela constituição e manutenção da vida dos seres vivos. Como possibilita a dissolução de grande número de substâncias, a água é denominada solvente universal, o que possibilita a sua poluição e contaminação (FELTRE, 2004).

Estimativas indicam que apenas 10 % da água utilizada diariamente no planeta Terra é destinada ao uso doméstico; grandes quantidades de água são utilizadas por indústrias e pela agricultura, possibilitando o escoamento de resíduos para corpos d'água e lençóis freáticos (BAIRD; CANN, 2011; FROTA; VASCONCELOS, 2019). E, desde o aparecimento do ser humano, diversos resíduos são produzidos e lançados em ambientes aquáticos, como mares, rios e lagos (MARQUES JÚNIOR; MORAES; MAURAT, 2009).

A contaminação é definida como a presença de agentes químicos ou etiológicos que podem prejudicar a saúde humana, animal e ambiental (saúde única) (ARANA, 1997; FROTA, 2018). Em ambientes aquáticos, a contaminação está associada à transmissão, através da água, de elementos, compostos ou micro-organismos que podem causar danos à saúde dos seres humanos ou dos organismos que nesses ambientes vivem e se alimentam (ARANA, 1997). Pesquisas sobre os impactos desses contaminantes em ambientes aquáticos têm ganhado mais ênfase nas produções científicas, assim como análises sobre os efeitos da deposição de resíduos industriais e seus impactos na saúde única (CABRAL; SILVA, 2016).

Variadas substâncias são responsáveis pela contaminação aquática, como pesticidas, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos e solventes orgânicos (EVANGELOU, 1998). De acordo com Bernhardt (1990), a saúde ambiental de corpos d'água é afetada pelas atividades humanas, como:

- (1) Lançamento de esgotos domésticos.
- (2) Recepção da água de chuva, que escoar por áreas agrícolas e sobre solos sujeitos a erosão;
- (3) Recepção de água de chuva proveniente de regiões com poluição atmosférica como, por exemplo, chuvas ácidas;
- (4) Percolação do chorume de lixões próximos aos corpos de água;
- (5) Compostos tóxicos oriundos de pesticidas utilizados na agricultura e no reflorestamento; e
- (6) Águas contaminadas por xenobióticos*, compostos orgânicos resistentes e traços de produtos farmacêuticos.

***Xenobióticos**: substâncias químicas estranhas ao organismo animal e humano (SANTUCCI, 2016).

A avaliação dos efeitos ecotoxicológicos dos contaminantes pode ser realizada com a análise da diversidade biológica encontrada no ambiente, interações e níveis tróficos dos organismos, reprodução e sensibilidade das espécies (NIKINMAA, 2014). A contaminação ambiental pode levar os seres vivos à mortalidade, suscetibilidade a doenças, mudanças de comportamento e problemas de reprodução e desenvolvimento, resultando em desequilíbrios ambientais (DI GIULIO; NEWMAN, 2012).

A Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que 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”, estabelece limites individuais para diversas substâncias de teor contaminante em cada classe (BRASIL, 2005).

2.1.1 Metais pesados

O termo metal pesado é utilizado para denominar elementos químicos que possuem densidade maior que 5 g/cm^3 . A toxicidade e a biodisponibilidade desses metais variam por diversos fatores, como a forma físico-química que eles se apresentam e a bioacumulação nos organismos (MARQUES JÚNIOR; MORAES; MAURAT, 2009).

Os metais pesados encontrados no meio ambiente são na sua maioria efluentes resultantes de indústrias químicas, metalúrgicas ou de atividades de mineração e geralmente são lançados na água (CONFALONIERI; HELLER; AZEVEDO, 2010). Quando presentes em altas concentrações, são capazes de prejudicar o processo biológico aeróbico ou anaeróbico e serem tóxicos aos organismos vivos (MEDEIROS, 2005).

Para Baird e Cann (2011), o arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), crômio (Cr) e mercúrio (Hg) são os metais mais perigosos nos ecossistemas. Para cada um desses, a ligação covalente a um ou mais grupos orgânicos gera compostos que podem se acumular em peixes e em outros organismos aquáticos (ERICKSON *et al.*, 2008).

Os metais são absorvidos ou penetram nos seres vivos aquáticos através das vias respiratória, cutânea e digestiva. Por meio da água, os organismos aquáticos extraem o oxigênio dissolvido e os alimentos para sua sobrevivência, sendo constantemente expostos às partículas metálicas presentes no ambiente. Dentre esses, os moluscos se destacam por concentrarem íons metálicos com facilidade no seu interior por sua fisiologia filtradora (FROTA, 2018).

Mesmo em concentrações pequenas, a exposição prolongada aos metais pesados pode ser prejudicial (VIGIL, 2003). Os efeitos que essas substâncias causam aos organismos aquáticos incluem necrose e apoptose de células, alterações histopatológicas nos rins e hipocalcemia (BONGA; LOCK, 2008).

2.1.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias que contêm dois ou mais anéis benzênicos fundidos, sendo, algumas dessas substâncias, bastante nocivas aos seres vivos (BRUICE, 2006; COSTA; MENEZES, 2015). O benzo[a]pireno é um dos compostos mais perigosos desse grupo, que é constituído também pelo naftaleno, antraceno e fenantreno - substâncias mais simples dessa classe (CAREY, 2011).

Os HPAs são conhecidos como poluentes orgânicos persistentes (POPs) por seus impactos no ecossistema e são oriundos de atividades antropogênicas (queima de materiais como madeira, carvão e tabaco) e naturais (petróleo), com potenciais riscos à saúde humana e animal em razão das suas características tóxicas, mutagênicas, cancerígenas e teratogênicas que alguns compostos apresentam (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

O petróleo é um combustível fóssil, constituído em sua grande parte de hidrocarbonetos e, na sua forma pura, é um líquido altamente inflamável (PROUSEK, 1993). É hidrofóbico, já que a maioria das suas ligações são relativamente apolares; portanto, é insolúvel em água (REECE *et al.*, 2015). Apesar dos acidentes marítimos envolvendo derramamento de petróleo ganharem bastante atenção, essa contribuição é apenas uma pequena parte do petróleo encontrado nos oceanos, com as maiores partes sendo oriundas de operações rotineiras de transporte, efluentes urbanos e sedimentos contaminados (MARQUES JÚNIOR; MORAES; MAURAT, 2009).

Os produtos petrolíferos são demasiadamente odoríferos e pequenas quantidades na água podem causar sabor desagradável (*off-flavor*) nos animais aquáticos (TUCKER; HARGREAVES; BOYD, 2008).

2.1.3 Pesticidas organoclorados

Os pesticidas são substâncias químicas que são lançadas no ambiente para eliminar ou controlar algum tipo específico de praga, como insetos (inseticidas), ervas daninhas (herbicidas) ou fungos (fungicidas) (HITES, 2007). Três classes principais de pesticidas são mais comumente utilizadas: organoclorados, organofosforados e carbamatos. Os organoclorados têm sido os mais utilizados por décadas e são os mais persistentes de todos os grupos de pesticidas (ALLOWAY, 1999).

O primeiro e o mais conhecido é o diclorodifeniltricloroetano (DDT). O DDT possui baixa solubilidade em água e por não ser facilmente metabolizado, deposita-se e se mantém nos tecidos adiposos dos animais. No meio aquático, é rapidamente absorvido pelos organismos, no entanto, pode também evaporar (FROTA; VASCONCELOS, 2019).

O DDT causa biomagnificação, que é o acúmulo de contaminantes nos diferentes níveis tróficos de uma cadeia alimentar. Como era utilizado como pesticida, ocorria contaminação das águas no entorno das localidades onde era aplicado em função do escoamento superficial destas áreas. As concentrações de DDT no meio aquático são baixas, mas como é uma substância bastante persistente, foi se biomagnificando na cadeia alimentar (PEDROZO; KUNO, 1996; LIMA, 2001).

O uso de DDT e outros organoclorados com destino para agricultura foi proibido no Brasil pela Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985, do atual Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1985). Seu uso completo foi proibido no ano de 2009 pela Lei da Presidência da República nº 11.936, de 14 de maio de 2009, que dispõe sobre a proibição da fabricação, importação, exportação, manutenção em estoque, comercialização e o uso do DDT em todo país (BRASIL, 2009).

Ainda que o uso de organoclorados tenha diminuído ou sido proibido em muitos países, esses compostos permanecem como POPs em ambientes rurais, urbanos e em águas subterrâneas e superficiais (BURCHAM, 2014). Alguns dos pesticidas com impacto em meios aquáticos são o metoxicloro, dieldrin, endrin, clordano, aldrin, heptacloro, toxafeno, lindano e endossulfan – todos banidos em diversos países (MANAHAN, 2017).

2.1.4 Pesticidas organofosforados e carbamatos

Considerados como os substitutos dos pesticidas organoclorados por serem menos persistentes e bioacumuladores, os pesticidas organofosforados e carbamatos são considerados derivados do ácido fosfórico e ácido carbâmico, respectivamente. Ambos possuem modo de ação semelhantes, por inibição de enzimas do sistema nervoso (BAIRD; CANN, 2011).

O malation ou malatão e clorpirifós são uns dos pesticidas organofosforados mais utilizados atualmente, com o primeiro aparentando ter menor toxicidade em relação aos outros organofosforados (HITES, 2007). No entanto, Fischer (2021) ao observar estudos com malation e seus efeitos em peixes, constatou que mesmo em níveis dentro do permitido pelo CONAMA, foram constatados efeitos negativos sobre essa classe de vertebrados.

Aldicarb e carbofurano, ambos solúveis em água, representam os carbamatos mais relevantes dentro dos ecossistemas aquáticos (WEINER, 2008). O aldicarb é um inseticida, mas também é conhecido por ser a principal substância do chumbinho, um raticida ilegal no Brasil. O aldicarb foi retirado do mercado brasileiro pelo Ato nº 54, de 9 de outubro de 2012, do MAPA, quando o único produto legal teve seu registro cancelado (BRASIL, 2012). O carbofurano foi banido do País por meio da Resolução nº 185, de 18 de outubro de 2017 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2017).

A maioria dos carbamatos são inseticidas de pequeno espectro, grande parte é menos tóxica para humanos e demais mamíferos que os organofosforados (GIRARD, 2013). Por causa dos riscos à saúde única, o uso de pesticidas organofosforados e carbamatos está sendo restringido ou proibido em diversos países (SPIRO; STIGLIANI, 2009).

2.1.5 Organoestanhos: tributilestanho (TBT) e dibutilestanho (DBT)

Os organoestanhos fazem parte dos compostos organometálicos e são frequentemente utilizados como estabilizadores de calor ou catalisadores na produção de policloreto de polivinila (PVC), utilizados como pesticidas, no tratamento e preservação da madeira e na fabricação de papel. O organoestânico de maior relevância ambiental é o tributilestanho (TBT) devido ao seu uso em embarcações e contato direto com a água (POWELL, 1988; ROCHA-BARREIRA; CASTRO, 2020).

O TBT é o principal composto organoestânico, apresentando grande relevância e preocupação para o ecossistema aquático, pois foi utilizado como tinta anti-incrustante durante décadas, sendo aplicado nos cascos de navios para evitar a incrustação de organismos como algas e mexilhões (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

Os compostos de TBT são extremamente tóxicos e possuem propriedades biocidas de amplo espectro e sua longevidade garantem um bom rendimento de velocidade e economia de combustível para as embarcações, além de uma longa vida útil entre as repinturas. O uso de TBT como tinta anti-incrustante não se restringiu somente a grandes navios e foi utilizado em diversas embarcações, de pequenos iates a navios petroleiros, garantindo a dispersão global do TBT em diversos ecossistemas aquáticos (MORA, 1999).

Os efeitos do TBT nos organismos aquáticos são diversos, sendo considerado um contaminante de preocupação mundial. Além de letal em altas concentrações, são observados problemas como deformidades em conchas de moluscos e ostras, anomalias reprodutivas e de crescimento em crustáceos, peixes e moluscos, principalmente nas fases larvais desses seres (ALZIEU, 1996; ROCHA-BARREIRA; CASTRO, 2020).

O uso TBT como anti-incrustante foi proibido pela Organização Internacional Marítima (IMO) de forma total no ano de 2008, através Resolução A.895(21), de 1999 (INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION, 1999). No entanto, Lima (2019) ressalta que ainda é possível encontrar a substância sendo vendida e usada clandestinamente, principalmente em países que não seguem a legislação internacional.

O dibutilestanho (DBT) é um produto derivado da degradação do TBT e também é motivo de preocupação por contaminar os ambientes aquáticos (MAGUIRE, 1996). Compostos de DBT podem ser encontrados com altas concentrações em organismos aquáticos, sendo mais tóxico em invertebrados e espécies filtradoras (PLETSCH; BERETTA; TAVARES, 2010; ZHANG *et al.*, 2016).

2.2 Biomonitoramento

O ecossistema pode ser contaminado por diversos compostos e com a realização de estudos é possível saber quais são esses contaminantes. Esses estudos são denominados de monitoramento ambiental, já que monitoram os mais diversos aspectos da biosfera, ou seja, promovem a observação e estudo do ambiente (ARTIOLA; PEPPER; BRUSSEAU, 2004).

O monitoramento não acontece somente por meio da mensuração de parâmetros físico-químicos, a avaliação quantitativa ou qualitativa da biota é frequentemente realizada para dar uma indicação da presença ou ausência de contaminantes. Este processo é conhecido como monitoramento biológico ou biomonitoramento e é bastante realizado em ambientes aquáticos (HEWITT; ALLOTT, 1999).

De forma geral, biomonitoramento pode ser definido como o uso de organismos (biomonitores) ou materiais biológicos para obter determinadas informações ou características do bioma, como por exemplo, a presença de certos contaminantes através das respostas dos organismos para avaliar mudanças ocorridas no ambiente aquático. As respostas observadas através das reações dos biomonitores podem ser de ordem fisiológica, morfológica, bioquímica ou comportamental (OLIVEIRA; KUMMROW, 1996; LIMA, 2001).

Ibanez *et al.* (2007) definem quatro abordagens principais para o biomonitoramento *in situ* em casos de contaminação:

- (a) Corroboração da presença ou ausência de espécies em um local, ou mudanças na composição das espécies (ou seja, "efeitos na comunidade").
- (b) Medição das concentrações de poluentes em organismos coletados em campo.
- (c) Avaliação dos efeitos dos poluentes nos organismos e relacioná-los com as concentrações nesses organismos e outros indicadores bióticos e abióticos.
- (d) Detecção de cepas geralmente diferentes de espécies que desenvolveram resistência em resposta a um poluente (IBANEZ *et al.*, 2007).

Quando os biomonitores são coletados e analisados é possível realizar associações da bioacumulação com a concentração no meio aquático, por exemplo, observando o impacto do contaminante no meio (QUEIROZ; SILVA; TRIVINHO-STRIXINO, 2008). Segundo Bernardi *et al.* (2008), o biomonitoramento é muito relevante nas avaliações de impacto ambiental, servindo para identificar qual a possibilidade de dano e minimizá-lo. Para os autores citados, na escolha dos organismos é preciso observar algumas características, como o tipo de experimentação necessária, distribuição vasta e conhecimentos biológicos da espécie, certo grau de estabilidade e uniformidade genética e sensibilidade constante da espécie a agentes químicos.

Diversos fatores também influem na biodisponibilidade de produtos químicos para os organismos, como: variação de temperatura, interações com outros poluentes, características de chuva, potencial hidrogeniônico (pH), salinidade, entre outros. Consequentemente, torna-se dificultosa a determinação com exatidão de até que ponto os resíduos químicos são assimilados pela biota, assim como seus efeitos biológicos no campo (IBANEZ *et al.*, 2007).

Lima (2001) ressalta os conceitos de biomonitoramento ativo e passivo. No passivo, o monitoramento é feito no ambiente natural com os organismos autóctones; no ativo, os organismos são observados em condições controladas. As reações destes podem ser medidas tanto em ambientes limpos (como forma de controle) quanto em ambientes impactados (NIKINMAA, 2014).

Na Resolução nº 357/2005 do CONAMA, § 3º do Art. 8º consta que “a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas” (BRASIL, 2005). Esses organismos podem servir como indicadores para vários tipos de poluentes. Vegetais superiores, fungos, líquens e musgos são alguns exemplos de organismos que podem ser biomonitores importantes para contaminação de metais pesados nos ecossistemas (MANAHAN, 2017).

No ambiente aquático, destacam-se algumas espécies de algas, crustáceos, moluscos e peixes nos estudos de biomonitoramento de contaminantes (BERNARDI *et al.*, 2008). Incontáveis estudos de biomonitoramento com a utilização de organismos aquáticos já foram realizados (TANAKA *et al.*, 2005; NIKINMAA, 2014). Tanaka *et al.* (2005) ao realizarem um bioensaio com *Paramecium bursaria*, um protozoário ciliado de algas marinhas, sugeriram que este pode ser um organismo muito útil para desenvolver um sistema de biomonitoramento da contaminação química da água.

Outro exemplo é o estudo do mexilhão azul por meio do programa de biomonitoramento marinho “*Mussel Watch*”, realizado desde a década de 1980 com o objetivo de avaliar o estado do ambiente marinho em regiões costeiras do hemisfério norte. Nos oceanos, o mexilhão azul é uma das espécies mais estudadas toxicologicamente, sendo utilizado também na avaliação de adaptações genéticas à contaminação, em toxicologia reprodutiva e em acúmulo de metais (NIKINMAA, 2014).

2.3 Biomarcadores

Os organismos são constantemente afetados por contaminantes no meio ambiente que provocam diversas reações neles. Para o monitoramento ambiental, ainda são observados muitos desafios, como por exemplo o metabolismo e limitações tecnológicas que podem tornar um produto químico difícil de ser detectado em amostras e a incapacidade de avaliar quantitativamente a disponibilidade de um produto químico da matriz ambiental para o

organismo. O uso de biomarcadores ajuda na resolução de alguns desses problemas, fornecendo uma medida direta da resposta de um organismo à exposição química (SCHLENK *et al.*, 2008).

Sendo assim, biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas a compostos químicos que indicam um desvio da normalidade, produzindo reações bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e comportamentais consideradas como biomarcadores. Estas respostas correspondem apenas ao nível individual ou menor, respostas em níveis mais altos (populações, comunidades e ecossistemas), não condizem com esse conceito (WALKER, 2014).

Para Nikinmaa (2014), um biomarcador ideal possui algumas características como a facilidade de ser medido, medições rápidas e baratas, medição específica para um tipo de contaminante e uma relação concentração-resposta. Os biomarcadores são classificados de duas formas: biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito. Os de exposição indicam a exposição do organismo às substâncias químicas, mas não apresentam mais informações sobre o grau do efeito tóxico; já os de efeito mostram a reação adversa no organismo (IBANEZ *et al.*, 2007).

Os biomarcadores são utilizados como marcadores de poluição ambiental, por exemplo, nas contaminações por petróleo, e podem ser utilizados nos diversos ecossistemas aquáticos (PETERS; WALTERS; MOLDOWAN, 2004). O uso de biomarcadores é intrínseco ao biomonitoramento, pois auxilia no alerta precoce de danos ecológicos (BERNARDI *et al.*, 2008). Na Tabela 1 são sumarizados alguns biomarcadores aplicados em ecossistemas aquáticos, organismos e contaminantes relacionados.

Tabela 1 - Biomarcadores utilizados em ambientes aquáticos

Biomarcadores	Organismos	Contaminantes
Inibição da acetilcolinesterase (AChE)	Peixes, moluscos e crustáceos	Pesticidas organofosforados e carbamatos
Indução de metalotioneínas	Peixes	Metais (ex: Zn, Cu, Cd, Hg)
Formação de adutos de ácido desoxirribonucleico (DNA)	Peixes, moluscos	HPAs, pesticidas triazínicos
Inibição de ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALAD)	Peixes	Chumbo
Indução de vitelogenina	Peixes	Compostos desreguladores endócrinos

Fonte: Adaptado de Guaratini *et al.* (1996).

2.4 Peixes como Bioindicadores de Qualidade Ambiental

No biomonitoramento, os parâmetros são analisados por meio dos organismos monitores, também chamados de bioindicadores. O uso destes permite a comprovação do impacto da contaminação em um ambiente, além de atestar a distribuição espacial e temporal dos efeitos causados pelos contaminantes (KLUMMP, 2001). A distribuição e abundância de organismos aquáticos, como os peixes, é relacionada com a qualidade dos ambientes em que estes estão inseridos. Com o aumento de contaminantes na água, a diversidade de peixes diminui (NAIGAGA *et al.*, 2011).

Nos ecossistemas aquáticos, os peixes podem ser considerados como uma das principais espécies bioindicadoras, devido à sua disponibilidade e importância comercial e recreativa (LOGAN, 2007; MANAHAN, 2017). O uso desses animais na bioindicação é mais vantajoso que apenas mensurar os parâmetros físico-químicos da água, pois são facilmente identificáveis e possuem sensibilidade à diferentes estressores (FIERRO *et al.*, 2017).

Os poluentes afetam diretamente células, tecidos e órgãos dos peixes. A nível celular, os lisossomos, por exemplo, são afetados por metais e HPAs, que se acumulam e provocam danos ao citoplasma. As brânquias são um dos principais órgãos afetados por estarem expostas ao meio contaminado e são passíveis ao aparecimento de lesões, hiperplasias e fusão de lamelas (DI GIULIO; NEWMAN, 2012). Esse acúmulo de substâncias é importante pois permite utilizar os peixes – e outros organismos aquáticos – no biomonitoramento de ecossistemas impactados (PHILLIPS; RAINBOW, 1994).

Além das brânquias, os rins e fígado se destacam como órgãos que apresentam alterações por causa da toxicidade do meio (LINS *et al.*, 2010). Conforme constatado por Jacovani (2019), os parasitos dos peixes também podem ser utilizados como bioindicadores e em alguns casos podem apresentar concentrações de contaminantes maiores que as encontradas no próprio peixe.

Alterações comportamentais e reprodutivas também podem ser observadas nos peixes na bioindicação. Apesar dos programas de biomonitoramento analisarem a resposta ao estresse, esta pode ser resultado de outros fatores não relacionados aos contaminantes; logo, é preciso estar atento ao fator estresse, principalmente na ação de captura dos bioindicadores, pois pode confundir ou mascarar os efeitos de substâncias tóxicas (CHOVANEC; HOFER; SCHIEMER, 2003).

Os peixes também são indicadores para ambientes poluídos por esgotos que afetam os aspectos físico-químicos da água, sendo possível relacionar o impacto dos poluentes nos

aspectos comportamentais e mortalidade da ictiofauna através da mensuração e monitoramento dos aspectos físico-químicos do meio aquático (VIADANA, 2001). A avaliação da água proporciona apenas uma visão geral das condições do ambiente aquático, ao passo que os peixes fornecem dados mais específicos (PLESSL *et al.*, 2017).

Quando expostos à baixas concentrações de elementos tóxicos e por pouco tempo, os peixes respondem de forma a compensar o efeito tóxico e não apresentam danos significativos. No entanto, quando expostos de forma prolongada e em concentrações maiores, o organismo reage provocando diversas alterações funcionais e estruturais, resultando em desequilíbrio na homeostase (CHOVANEC; HOFER; SCHIEMER, 2003).

2.5 Características do Ecossistema Lacustre da Baixada Maranhense

Lagos, lagoas, represas e campos alagados são classificados como ecossistemas lacustres (TUNDISI; TUNDISI, 2008). A formação de ambientes lacustres está relacionada, na maioria das vezes, a manifestações naturais como atividades tectônicas, vulcânicas, glaciais, erosões, sedimentações e ações de rios (SPERLING, 1999).

Conforme estabelecido pelo Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos (IMESC), a Microrregião Geográfica da Baixada Maranhense é composta por 21 municípios e se constitui geomorfologicamente por campos, tesos, lagos e morros e possui um clima demarcado por um período seco e outro chuvoso. Os campos podem ser alagáveis, formando lagos temporários (DIAS, 2006; IMESC, 2013). Por meio do Decreto nº 11.900, de 11 de julho de 1991, a Baixada Maranhense foi definida como uma Área de Proteção Ambiental (APA) com o objetivo de preservar este ecossistema (MARANHÃO, 1991).

Devido à biodiversidade e da quantidade de lagos existentes, os ecossistemas lacustres da Baixada Maranhense são alvos da execução constante de variados estudos, não somente de peixes (CANTANHÊDE, 2017; PEREIRA, 2020; CARVALHO *et al.*, 2021) mas como também de outros organismos (ALMEIDA *et al.*, 2005; BARBIERI; CARREIRO, 2017; SANTOS *et al.*, 2020) e de variáveis ambientais (COSTA-NETO *et al.*, 2001; CAMPOS NETO; SOUZA; FEITOSA, 2008; SILVA, 2019). Os peixes se destacam na biota lacustre da região e a principais espécies de peixes encontradas estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais espécies de peixes em ambientes lacustres da Baixada Maranhense

Nome popular	Nome científico
Curimatá	<i>Prochilodus scrofa</i>
Traíra	<i>Hoplias malabaricus</i>
Piranha	<i>Pygocentrus nattereri</i>
Acará	<i>Geophagus brasilienses</i>
Piau	<i>Leporinus obtusidens</i>
Tapiaca	<i>Curimata cyprinoides</i>
Piaba	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Jeju	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>
Bagrinho	<i>Trachelyopterus galeatus</i>

Fonte: IMESC (2013); Viana *et al.* (2013).

2.6 Caracterização do *Cichlasoma bimaculatum* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*

O acará preto, nome popular do *Cichlasoma bimaculatum*, é um peixe bento-pelágico de água doce da Família Cichlidae (Cichliformes), distribuído principalmente na América do Sul (FROESE; PAULY, 2022). O *C. bimaculatum* é encontrado em ecossistemas lacustres e é capaz de tolerar baixos níveis de oxigênio. Possui manchas escuras nas laterais do corpo que podem se estender formando uma faixa e mede em média 12 cm (PAIGE; BURR, 1991).

Os peixes da espécie *Hoplerythrinus unitaeniatus*, conhecidos popularmente como jeju, são organismos de água doce da Família Erythrinidae (Characiformes), amplamente distribuídos na América Central e do Sul (FROESE; PAULY, 2022). Estes peixes são bento-pelágicos, além de terem corpo cilíndrico e uma longa faixa que se estende desde o opérculo até a nadadeira caudal (VENERE; GARUTTI, 2011).

Por possuir uma bexiga natatória bem desenvolvida, o *H. unitaeniatus* apresenta respiração aérea facultativa, sendo comum que suba à superfície para tomada de ar, além de ser capaz de se movimentar entre lagoas por via terrestre (BOUJARD *et al.*, 1997; NELSON; GRANDE; WILSON, 2016). Por ser um peixe de médio porte, não é apreciado para aquários (também pelo fato de serem agressivos e possuírem tamanho incompatível com esse meio) e não tão vantajoso para ser comercializado em grandes escalas (LEAL *et al.*, 2010).

REFERÊNCIAS

- ALLOWAY, B. J. Land Contamination and Reclamation. *In*: HARRISON, R. (ed.). M. **Understanding Our Environment**: an introduction to environmental chemistry and pollution. 3. ed. Cambridge: Royal Society Of Chemistry, 1999. p. 199-236.
- ALMEIDA, I. C. da S. *et al.* Comunidade fitoplanctônica do lago Cajari, Baixada Maranhense, no período de cheia. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**. v. 18, n. 1, p. 1-9, 2005.
- ALZIEU, C. Biological effects of tributyltin on marine organisms. *In*: MORA, S. J. de (ed.). **Tributyltin: case study of an environmental contaminant**. New York: Cambridge University Press, 1996. p. 167-211.
- ARANA, L. V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis: UFSC, 1997. p. 115-138.
- ARTIOLA, J. F.; PEPPER, I. L.; BRUSSEAU, M. L. Monitoring and characterization of the environment. **Environmental Monitoring And Characterization**, [S.L.], p. 1-9, 2004. Elsevier. doi: 10.1016/b978-012064477-3/50003-5
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.
- BARBIERI, R.; CARREIRO, J. G. Ecologia de macrófitas aquáticas em campo inundável na APA da Baixada Maranhense. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, [S. L.], v. 27, n. 1, p. 1-8, jan. 2017. Disponível em: <<http://periodicos eletronicos.ufma.br/index.php/blabohidro/article/view/8165>>. Acesso em: 06 mai. 2022.
- BERNARDI, M. M. *et al.* **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p. 812-858.
- BERNHARDT, H. Control of Reservoir Water Quality. *In*: HAHN, H. H.; KLUTE, R. (ed.). **Chemical Water and Wastewater Treatment**. Berlin: Springer, 1990. p. 285-304. doi: 10.1007/978-3-642-76093-8
- BONGA, S. E. W.; LOCK, R. A. C. The Osmoregulatory System. *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton: Crc Press, 2008. p. 401-415. doi: 10.1201/9780203647295
- BOUJARD, T. *et al.* **Poissons de Guyane: Guide écologique de l'Approuague et de la réserve des Nouragues**. Paris: INRA Editions, 1997. 219 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Proíbe, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária, dentre

outros. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de setembro de 1985. Disponível em:
https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/mapa_gm/1985/prt0329_02_09_1985.html. Acesso em: 06 mai. 2022.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 15 de junho de 2005. 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 de março de 2005. Disponível em:
http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=450. Acesso em: 06 mai. 2022.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 11.936, de 14 de maio de 2009. Proíbe a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de diclorodifeniltricloreto (DDT) e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 de maio de 2009. Disponível em:
https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/lei/11936.htm. Acesso em: 06 mai. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato nº 54, de 9 de outubro de 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 de outubro de 2012. Disponível em:
<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=16/10/2012&jornal=1&pagina=9&totalArquivos=112>. Acesso em: 06 mai. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 185, de 18 de outubro de 2017. Dispõe sobre a proibição do ingrediente Carbofurano em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de descontinuação de seu uso nas culturas de banana, café e cana-de-açúcar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 de outubro de 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19362345/do1-2017-10-19-resolucao-n-185-de-18-de-outubro-de-2017-19362255. Acesso em: 06 mai. 2022.

BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. 2 v. p. 65-66.

BURCHAM, P. C. **An Introduction to Toxicology**. Londres: Springer, 2014. 327 p.
doi:10.1007/978-1-4471-5553-9

CABRAL, P. F.; SILVA, A. C. da. Teor de contaminantes inorgânicos nas águas do rio Alterado na Vila Maranhão, São Luís, Maranhão. In: SÁ-SILVA, J. R.; MACEDO-SILVA, W.; SANTOS, W. H. L. dos (org.). **Estudos em Meio Ambiente e Recursos Aquáticos**. São Luís: Uema, 2016. p. 43-62.

CAMPOS NETO, J. de R. C.; SOUZA, U. D. V.; FEITOSA, A. C. **Variáveis Ambientais do Lago do Coqueiro em Olinda Nova do Maranhão**. VII Simpósio Nacional de

Geomorfologia SINAGEO e II Encontro Latino-Americano de Geomorfologia, Anais do VII Sinageo, Belo Horizonte, 2008. Disponível em: <http://lsie.unb.br/ugb/sinageo/7/0407.pdf>. Acesso em: 06 mai. 2022.

CANTANHÊDE, L. G. *et al.* Reproductive ecology of the catfish, *Hassar affinis* (ACTINOPTERYGII: DORADIDAE), in three lakes of the Pindaré-Mearim Lake System, Maranhão. **Revista Ciência Agronômica**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 464-472, jul. 2017. doi: 10.5935/1806-6690.20170054.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. 7. ed. Porto Alegre: Amgh, 2011. p. 458-459.

CARVALHO, I. F. da S. *et al.* Parâmetros reprodutivos de *Pygocentrus nattereri* Kner, 1858 (PISCES: CHARACIFORMES, SERRASALMINAE) no lago Cajari, Baixada Maranhense, Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 11, n. 2, p. 22-26, maio 2021. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/5284/v11n2p22-26.pdf>. Acesso em: 06 mai. 2022.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. *In*: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (ed.). **Bioindicators and Biomonitors**. [S.L.]: Elsevier, 2003. p. 639-676. doi:10.1016/s0927-5215(03)80148-0

CONFALONIERI, U.; HELLER, L.; AZEVEDO, S. Água e Saúde: Aspectos Globais e Nacionais. *In*: BICUDO, C. E. de M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUENSTUHL, M. C. B. (org). **Águas do Brasil: análises estratégicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2010. p. 27-38.

COSTA-NETO, J. P. *et al.* Limnologia de três ecossistemas aquáticos característicos da Baixada Maranhense. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, São Luís, v. 14, n. 1, 2001. Disponível em: <http://periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/blabohidro/article/view/2125>. Acesso em: 06 mai. 2022.

COSTA, S. M. O.; MENEZES, J. E. S. A. **Química orgânica I**. 2. ed. Fortaleza: Eduece, 2015. 167 p.

DIAS, L. J. B. da S. **Proposta metodológica de zoneamento ambiental aplicada ao município de Anajatuba (MA)**. 2006. 123 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia e Limnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

DI GIULIO, R. T., NEWMAN, M. C. Ecotoxicologia. *In*: KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: Amgh, 2012. p. 391-399.

ERICKSON, R. J. *et al.* Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton: Crc Press, 2008. p. 09-54. doi: 10.1201/9780203647295

EVANGELOU, V. P. **Environmental soil and water chemistry: principles and applications**. [S. L.]: Wiley, 1998. 592 p.

FELTRE, R. **Química: físico-química**. 6. ed. São Paulo: Moderna, 2004. 417 p.

FIERRO, P. *et al.* Macroinvertebrates and Fishes as Bioindicators of Stream Water Pollution. *In*: TUTU, H. (ed.). **Water Quality**. London: IntechOpen, 2017. p. 23-38. doi:10.5772/65084

FISCHER, A. K. **Efeitos Adversos do Inseticida Malation sobre Peixes**. 2021. 89 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu. Disponível em: <http://dspace.unila.edu.br/123456789/6345>. Acesso em: 20 abr. 2022.

FROESE, R.; PAULY, D. (eds.). 2022. **FishBase, World Wide Web electronic publication**. Disponível em: < <https://www.fishbase.org>>, version (02/2022). Acesso em: 10 mai. 2022

FROTA, E. B; VASCONCELOS, N. M. S. de. **Química: química ambiental**. 2. ed. Fortaleza: Uece, 2019. 212 p.

FROTA, H. B. M. **Química Ambiental**. 2018. Disponível em: https://educacaoprofissional.seduc.ce.gov.br/images/material_didatico/quimica/quimica_quimica_ambiental_2019.pdf. Acesso em: 12 abr. 2022.

GIRARD, J. E. **Principles Of Environmental Chemistry**. 3. ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2013. 712 p.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 708-716, out. 2003. doi:10.1590/s0100-40422003000500015

GUARATINI, T. *et al.* Ecotoxicologia. *In*: OGA, S; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 126-141.

HEWITT, C. N.; ALLOTT, R. Environmental Monitoring Strategies. *In*: HARRISON, R. (ed.). **M. Understanding Our Environment: an introduction to environmental chemistry and pollution**. 3. ed. Cambridge: Royal Society Of Chemistry, 1999. p. 267-330.

HITES, R. A. **Elements of environmental chemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 157-173.

IBANEZ, J. G. *et al.* **Environmental Chemistry: Fundamentals**. New York: Springer, 2007. 334 p.

IMESC. Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. Secretaria de Estado do Planejamento e Orçamento. **Enciclopédia dos Municípios Maranhenses: microrregião geográfica da baixada maranhense**. São Luís: Imesc, 2013. 2 v. Disponível em: http://imesc.ma.gov.br/src/upload/publicacoes/ENC_MA_MICRORREGIAO_BAIXADA_MARANHENSE_2.pdf. Acesso em: 06 mai. 2022.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION. Resolução A.895(21), de 1999. AGREES that the legally binding instrument to be developed by the Marine Environment Protection Committee should ensure a global prohibition of the application of organotin compounds which act as biocides in anti-fouling systems on ships by 1 January 2003, and a complete prohibition of the presence of organotin compounds which act as biocides in antifouling systems on ships by 1 January 2008. ANTI-FOULING SYSTEMS USED ON SHIPS. [S. l.], Disponível em: [https://wwwcdn.imo.org/localresources/en/KnowledgeCentre/IndexofIMOResolutions/AssemblyDocuments/A.895\(21\).pdf](https://wwwcdn.imo.org/localresources/en/KnowledgeCentre/IndexofIMOResolutions/AssemblyDocuments/A.895(21).pdf). Acesso em: 23 abr. 2022.

JACOVANI, K. S. de M. **Parasitos de peixes como bioindicadores de impactos ambientais e análise da qualidade química da água nos rios jacaré-pepira e jacaré-guaçu, bacia hidrográfica do Tietê- Jacaré, estado de São Paulo, Brasil**. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Sagrado Coração, Bauru. Disponível em: <https://tede2.usc.br:8443/handle/tede/474>. Acesso em: 06 mai. 2022.

KLUMMP, A. Utilização de bioindicadores e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. In: MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. (org.). **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: Educ, 2001. p. 77-94.

LEAL, M. E. *et al.* Primeiro registro e aspectos ecológicos de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae) como espécie introduzida na Bacia do Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Biota Neotropica**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 33-37, set. 2010. doi: 10.1590/s1676-06032010000300002.

LIMA, G. M. de. Estanho: um metal estratégico ontem e hoje. **Química Nova**, [S. L.], v. 42, n. 10, p. 1989-1198, nov. 2019. doi: 10.21577/0100-4042.20170444

LIMA, J. S. Processos biológicos e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. In: MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. (org.). **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: Educ, 2001. p. 95-115.

LINS, J. A. P. N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 469, 15 out. 2010. Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR. doi: 10.7213/cienciaanimal.v8i4.11018

LOGAN, D. T. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish. **Human And Ecological Risk Assessment: An International Journal**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 302-316, 20 mar. 2007. doi: 10.1080/10807030701226749

MAGUIRE, R. J. The occurrence, fate and toxicity of tributyltin and its degradation products in fresh water environments. In: MORA, S. J. de (ed.). **Tributyltin: case study of an environmental contaminant**. New York: Cambridge University Press, 1996. p. 94-138

MANAHAN, S. E. **Environmental chemistry**. 10. ed. Boca Raton: Crc Press, 2017. 752 p. doi: 10.1201/9781315160474

MARANHÃO. Estado do Maranhão. Decreto nº 11.900, de 11 de junho de 1991. Cria, no Estado do Maranhão, a Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, compreendendo 03 (três) Sub-Áreas: Baixo Pindaré, Baixo Mearim-Grajaú e Estuário do Mearim-Pindaré – Baía de São Marcos incluindo a Ilha dos Caranguejos. **Diário Oficial [do] Estado do Maranhão**, São Luís, MA, 09 de outubro de 1991. Disponível em: documentacao.socioambiental.org/ato_normativo/UC/304_20100823_150533.pdf. Acesso em: 06 mai. 2022.

MARQUES JÚNIOR, A. N.; MORAES, R. B. C. de; MAURAT, M. C. Poluição Marinha. *In*: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (org.). **Biologia Marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. p. 505-528.

MEDEIROS, S. B. de. **Química Ambiental**. 3. ed. Recife: Revista e Ampliada, 2005. 122 p.

MORA, S. J. The Oceanic Environment. *In*: HARRISON, R. (ed.). **M. Understanding Our Environment: an introduction to environmental chemistry and pollution**. 3. ed. Cambridge: Royal Society Of Chemistry, 1999. p. 139-198.

NAIGAGA, I. *et al.* Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: a case study in lake Victoria Wetlands, Uganda. **Physics And Chemistry Of The Earth, Parts A/B/C**, [S.L.], v. 36, n. 14-15, p. 918-928, 2011. doi: 10.1016/j.pce.2011.07.066

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World**. 5. ed. Hoboken: Wiley, 2016. 752 p.

NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. [S.L.] Elsevier, 2014. 252 p. doi: 10.1016/C2012-0-07948-3

OLIVEIRA, D. P. de; KUMMROW, F. Poluentes da Atmosfera. *In*: OGA, S; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 143-164.

OLIVEIRA, A. H. B. *et al.* Hidrocarbonetos de petróleo. *In*: CAVALCANTE, R. M. (org.). **Contaminantes orgânicos em ambientes aquáticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020. p. 139-164. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/55985>. Acesso em: 20 abr. 2022.

PAGE, L. M.; BURR, B. M. **A field guide to freshwater fishes: North America North of Mexico**. Boston: Houghton Mifflin Harcourt, 1991. 432 p.

PEDROZO, M. de F.; KUNO, R. Contaminantes da Água e do Solo. *In*: OGA, S; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 199-224.

PEREIRA, K. C. M. **Aspectos da alimentação e identificação do nível trófico da raia de água doce *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no lago de Viana, Maranhão**. 2020. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de

Pesca) - Universidade Federal do Maranhão, Pinheiro. Disponível em: <https://monografias.ufma.br/jspui/handle/123456789/4565>. Acesso em: 06 mai. 2022.

PETERS, K.; WALTERS, C.; MOLDOWAN, J. **The Biomarker Guide**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 471 p. doi: 10.1017/CBO9780511524868

PHILLIPS, D. J. H.; RAINBOW, P. S. **Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants**. London: Chapman & Hall, 1994. 371 p. doi: 10.1007/978-94-011-2122-4

PLESSL, C. *et al.* Fish as bioindicators for trace element pollution from two contrasting lakes in the Eastern Rift Valley, Kenya: spatial and temporal aspects. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 24, n. 24, p. 19767-19776, 7 jul. 2017. doi: 10.1007/s11356-017-9518-z

PLETSCH, A. L.; BERETTA, M.; TAVARES, T. M. Distribuição espacial de compostos orgânicos de estanho em sedimentos costeiros e em *Phallusia nigra* da Baía de Todos os Santos e litoral norte da Bahia - Brasil. **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 451-457, mar. 2010. doi: 10.1590/s0100-40422010000200037.

POWELL, P. **Principles of Organometallic Chemistry**. 2. ed. [S. L.]: Springer, 1988. 414 p.

PROUSEK, J. Organic substances in waters. In: TOLGYESSY, J. (ed.). **Chemistry and biology of water, air, and soil: environmental aspects**. Amsterdam: Elsevier, 1993. p. 110-153.

QUEIROZ, J. F. de; SILVA, M. S. G. M.; TRIVINHO-STRIXINO, S. **Organismos bentônicos: biomonitoramento de qualidade de águas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 91 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/15644/organismos-bentonicos-biomonitoramento-de-qualidade-de-aguas>. Acesso em: 23 abr. 2022.

REECE, J. B. *et al.* **Biologia de Campbell**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 1487 p.

ROCHA-BARREIRA; C. A.; CASTRO, I. B. Compostos triorganoestânicos. In: CAVALCANTE, R. M. (org.). **Contaminantes orgânicos em ambientes aquáticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020. p. 248-355. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/55985>. Acesso em: 20 abr. 2022.

SANTOS, H. A. *et al.* Análise espaço temporal (2000 – 2014) da vegetação na microrregião Baixada Maranhense (Maranhão). **Revista Brasileira de Sensoriamento Remoto**, v.1, n.1, p. 2-10, 2020. Disponível em: <https://rbsr.com.br/index.php/RBSR/article/view/1/1>. Acesso em: 06 mai. 2022.

SANTUCCI, R. G. D. **Toxicologia Ambiental**. São Paulo: Unip, 2016. 92 p.

SCHLENK, D. *et al.* (ed.). In: **The toxicology of fishes**. Boca Raton: Crc Press, 2008. p. 684-731. doi: 10.1201/9780203647295

SILVA, V. A. R. **Perda de biodiversidade em função de pressão antrópica nas planícies inundáveis da Amazônia Maranhense**. 2019. 107 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal) - Programa de Pós-Graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/CCBS - Universidade Federal do Maranhão, São Luís. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/3064>. Acesso em: 06 mai. 2022.

SPERLING, E. von. **Morfologia de lagos e represas**. Belo Horizonte: Desa/Ufmg, 1999. 138 p.

SPIRO, T. G.; STIGLIANI, W. M. **Química Ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2009. 334 p.

TANAKA, M. *et al.* A New Bioassay for Toxic Chemicals Using Green Paramecia, *Paramecium bursaria*. In: LICHTFOUSE, E.; SCHWARZBAUER, J.; ROBERT, D. (ed.). **Environmental Chemistry**, Berlin: Springer, 2005. p. 673-680. doi: 10.1007/3-540-26531-7_61

TUCKER, C. S.; HARGREAVES, J. A.; BOYD, C. E. Better Management Practices for Freshwater Pond Aquaculture. In: TUCKER, C. S.; HARGREAVES, J. A. (ed.). **Environmental Best Management Practices for Aquaculture**. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p. 151-226.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 632 p.

VENERE, P. C.; GARUTTI, V. **Peixes do Cerrado – Parque Estadual da Serra Azul – Rio Araguaia, MT**. São Carlos: Rima Editora, 2011. 220 p.

VIADANA, A. G. Estudo biogeográfico do *Astyanax bimaculatus* (Tambuí) na determinação da qualidade de hidrotopo no estado de São Paulo. In: MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. (org.). **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: Educ, 2001. p. 249-262.

VIANA, D. C. *et al.* Descrição do pescado na Baixada Maranhense – São Bento/MA. **Revista Científica Semana Acadêmica**, Fortaleza, v. 1, n. 42, p. 1-10, set. 2013. Disponível em: <<https://semanaacademica.org.br/artigo/descricao-do-pescado-na-baixada-maranhense-sao-bentoma>>. Acesso em: 06 mai. 2022.

VIGIL, K. M. **Clean Water**: an introduction to water quality and water pollution control. 2. ed. Corvallis: Oregon State University Press, 2003. 192 p.

WALKER, C. **Ecotoxicology**: effects of pollutants on the natural environment. Boca Raton: Crc Press, 2014. 233 p. doi: 10.1201/b16402

WEINER, E. R. **Applications of Environmental Aquatic Chemistry**: a practical guide. 2. ed. Boca Raton: Crc Press, 2008. 456 p.

ZHANG, S. *et al.* Derivation of freshwater water quality criteria for dibutyltin dilaurate from measured data and data predicted using interspecies correlation estimate models.

Chemosphere, [S.L.], v. 171, p. 142-148, mar. 2017. doi:

10.1016/j.chemosphere.2016.12.046.

CAPÍTULO III

USING GILL AND LIVER BIOMARKERS TO MONITOR THE HEALTH OF TWO NEOTROPICAL FISH SPECIES IN A LAKE ZONE IN MARANHÃO STATE

ABSTRACT - The aim of the current study is to histologically assess two Neotropical fish species (*Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum*) to monitor the health in a lake zone in Maranhão State. Forty-two (42) adult fish specimens were captured - 21 belonged to species *H. unitaeniatus* and 21, to species *C. Bimaculatum* -, euthanized and had their second right gill arch and liver fragments removed for histological analysis. Histological changes in specimens' gill and liver were semi-quantitatively assessed by calculating the histological alterations index (HAI) based on the severity of each lesion established as stages I, II and III. Results recorded for both species were presented together; they evidenced that both assessed organs have shown changes associated with all three severity stages. Gill changes mostly observed through the analysis comprised total (85.71%) and partial (85.71%) fusion of several lamellae, epithelial lifting (80.95%), congested blood vessels (76.19%), disorganized lamellae, (76.19%) and lamellar epithelial hyperplasia (76.19%) - stage I alterations. The most common liver changes comprised vacuolization (90.48%), melanomacrophage centers (78.57%), cellular contour deformation (66.67%) and nucleus at cell periphery (52.38%), stage I alterations and hyperemia (45.24%) and cytoplasmic degeneration (40.48%) - stage II alterations. Unlike the HAI indices recorded for gills, liver HAI values presented better balanced rates among severity classifications; therefore, it has evidenced a more severe condition. Thus, both organs analyzed in the investigated species have shown several histological changes that may have resulted from specimens' interactions with stressors capable of affecting their health.

Keywords: aquatic animals; stress; histology; lesions.

**BIOMARCADORES BRANQUIAIS E HEPÁTICOS PARA MONITORAMENTO DA
SANIDADE DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS EM ÁREA LACUSTRE
MARANHENSE, MARANHÃO**

RESUMO - Com o estudo objetivou-se avaliar histologicamente duas espécies de peixes neotropicais (*Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Cichlasoma bimaculatum*) para monitoramento da sanidade em uma área lacustre maranhense. Para isso, foram capturados 42 exemplares de peixes adultos, sendo 21 *H. unitaeniatus* e 21 *C. bimaculatum*, que foram eutanasiados e tiveram o segundo arco branquial direito e fragmentos de fígado retirados para análise histológica. As alterações histológicas branquiais e hepáticas foram avaliadas de forma semiquantitativa, por meio do cálculo do índice de alteração histológica (IAH), fundamentado na severidade de cada lesão estabelecida nos estágios I, II e III. Os resultados foram apresentados de forma conjunta para as duas espécies e foi constatado que ambos os órgãos possuíram alterações dos três estágios. As alterações branquiais mais observadas foram fusão completa (85,71%) e incompleta (85,71%) de várias lamelas, levantamento do epitélio (80,95%), congestão de vasos sanguíneos (76,19%), desorganização das lamelas (76,19%) e hiperplasia do epitélio lamelar (76,19%), todas de estágio I. As alterações hepáticas mais encontradas foram vacuolização (90,48%), centro de melanomacrófagos (78,57%), deformação do contorno celular (66,67%) e núcleo na periferia da célula (52,38%), alterações de estágio I e hiperemia (45,24%) e degeneração citoplasmática (40,48%), alterações de estágio II. Diferente dos índices de IAH das brânquias, o IAH do fígado apresentou porcentagens mais equilibradas entre as classificações, logo apresentou um quadro mais grave. Sendo assim, foi possível observar diversas alterações histológicas em ambos os órgãos das espécies avaliadas que podem ser resultado de interações com agentes estressores que impactam na sanidade dos espécimes.

Palavras-chave: animais aquáticos; estresse; histologia; lesões.

INTRODUCTION

Aquatic biota has been increasingly threatened by several stressors, such as variations in water temperature, salinity and pH, as well as low dissolved oxygen concentrations and

toxins produced by algae. Heavy metals, chemical residues and pesticides are the main stressors capable of harming fish, among other aquatic organisms, in lake environments (BOYD, 2017). These environments are vulnerable to contamination, since they can accumulate high concentrations of different chemicals that can be either directly applied to them or derive from land runoff coming from neighboring regions (DI GIULIO; HINTON, 2008).

Like other vertebrates, fish manage to maintain their integrity through their immune system, although its homeostasis and efficiency can be affected by stress and lead to immunosuppression issues (TORT, 2011). These animals are susceptible to several pathogens and non-infectious agents, with emphasis on stress, which plays key role in the emergence of different diseases. Water quality is essential to help maintaining these animals' health, since it affects their physiology, reproduction, growth and behavior. Therefore, it is possible saying that several diseases affecting fish result from inappropriate environmental management (NOGA, 2010).

Producing the least level of stress possible for animals should be one of the main goals in fish farming (STICKNEY, 2017). These organisms can be used as environmental quality bioindicators in water contamination and sanitation assessments, since they provide evidence of such issues through both the accumulation of substances in their bodies and the systemic effects resulting from their exposure to contaminants (MANAHAN, 2017). These stressors have significant impact on fish development and they can lead to malformations, deformities and death, in addition to cause atrophies, inflammation, necrosis and hyperplasia (DI GIULIO; NEWMAN, 2012).

Histological biomarkers can be used as diagnostic tool to determine the health of fish populations living in impacted environments, since they reflect aquatic ecosystems' conditions as a whole (PEREIRA et al., 2014). Histological studies conducted with fish often focus on different organs, mainly on the ones accounting for their metabolism, such as the liver, which can undergo structural and metabolic changes due to fish exposure to pollutants, toxins, microorganisms and parasites, as well as to the intake of certain food types (BOMBONATO et al., 2007; ROCHA et al., 2010).

According to De Jesus et al. (2022), most Maranhão State regions experience several environmental impacts, such as deforestation and pollution resulting from domestic sewage discharge, among others, as well as from impacts caused by livestock farming based on pigs, buffaloes and cattle breeding under precarious sanitary conditions. The aforementioned researchers have also advocated that environmental impacts can, at some point, contribute to animal stress, which, in its turn, can compromise animals' immune system and predispose them to develop diseases of different etiologies; consequently, it can compromise the dietary basis of several traditional communities.

Therefore, aquatic animals' health assessments based on histopathological analysis are of great value and extremely useful. Thus, the aim of the current study was to histologically assess two neotropical fish species (*Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum*) to monitor the health of a lake zone in Maranhão State.

MATERIALS AND METHODS

Legal Authorization

All the herein performed procedures were in compliance with the ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal -, <http://www.cobea.org.br>) and by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal) of Maranhão State University (UEMA - Universidade Estadual do Maranhão) - Protocol n. 08/2021.

Study Site

The study was carried out in a lake zone located in the rural area of Anajatuba County, Maranhão State. The aforementioned county belongs to Baixada Maranhense region and it is located between the following geographic coordinates: Latitude 03°15'50" S and Longitude 44°37'12" W.

Climate in the investigated region is of the AW type (humid tropical climate with dry winter season), based on Köppen's (1948) classification. The investigated region presents six-month dry season - three to four of these months are extremely dry, since they record

total rainfall rate lower than 8%. It also presents six-month rainy season - at least two of these months are extremely wet, since they record total rainfall rate higher than 30%.

Fish sample collection

Two sample collections were carried out, one in the rainy season (February 2021) and the other one, in the dry season (August 2021) - biannual interval was implemented between collections. Forty-two (42) adult male and female fish specimens were captured with the aid of 4-mesh (20 mm) casting net and 4-mesh (20 mm) gillnet - 21 specimens belonged to species *H. unitaeniatus (jeju)* (18.7 ± 2.5 cm and 92.7 ± 25.7 g) and 21, to species *C. bimaculatum* (black acara) (12.45 ± 0.77 cm and 44.32 ± 9.80 g).

Captured specimens were transported alive in isothermal boxes - which were filled with water from the capture site and provided with water oxygenation equipment - to the Laboratory for the Reproduction of Aquatic Resources (LARAQUA) at Maranhão State University (UEMA). Once in the laboratory, they were placed in tank filled with water and provided with constant oxygenation, for 12 hours, until analysis time.

Laboratory Processing and Histological Analysis

Fish were euthanized in laboratory environment by perforation in the upper part of their heads; it was done with the aid of a scalpel blade. All procedures were performed in compliance with ethical principles.

The second right gill arch and liver fragments were removed from each specimen with the aid of forceps and scissors, and fixed in 10% formalin. Histological analyses were performed at the Microscopy Laboratory of UEMA's Post-graduation Multiuser Laboratory (LAMP - Laboratório Multiusuários da Pós-Graduação). Gill and liver fragments were initially cleaved to reduce their dimensions to 3-5 mm, in thickness. It was done to enable the penetration and diffusion of reagents used at the histological processing stages.

Subsequently, the decalcification, dehydration, diaphanization, paraffin embedding and microtomy stages were carried out, based on Caputo; Gitirana; Manso (2010). Only gill samples were decalcified in 10% nitric acid, after fixation, for approximately six hours, in order to remove mineral salts from gill arches. Cross sections, approximately 5 μ m in

thickness, were stained with hematoxylin and eosin (HE). Slides were read under optical microscope, at 10x and 40x magnification, and the observed lesions were photomicrographed.

Histological alterations in gill and liver samples were semi-quantitatively assessed by calculating the histological alterations index (HAI) adapted from Poleksic; Mitrovic-Tutundzic (1994), depending on the severity of each lesion (Table 1), as follows: (i) stage I alterations – the ones that do not compromise organs' functioning; (ii) stage II - more severe lesions capable of impairing organs' normal functioning; and, (iii) stage III - extremely severe and irreversible lesions.

Table 1. Classification of histological alterations observed in gill and liver samples, based on lesions' severity stage.

Histological Alterations		
Gills	Liver	Stage
Congested blood vessels	Nucleus at cell periphery	I
Respiratory epithelium lifting	Cell contour deformation	
Disorganized lamellae	Cell hypertrophy	
Lamellar epithelial hyperplasia	Nuclear hypertrophy	
Partial fusion of several lamellae	Cell atrophy	
Total fusion of several lamellae	Nuclear atrophy	
Blood sinus dilation	Melanomacrophage centers	
Respiratory epithelium hypertrophy	Vacuolization	II
Lamellar epithelium bleeding and rupture	Nuclear vacuolization	
Mucus cell hyperplasia and hypertrophy	Cytoplasmic degeneration	
Chloride cell hyperplasia and hypertrophy	Hyperemia	
Total lamellar fusion	Cell disruption	
Uncontrolled proliferative tissue thickening	Bile stagnation	
Pillar cell rupture	Nuclear degeneration	
Lamellar aneurysm	Necrosis	III

Lamellar telangiectasia

Cell necrosis and degeneration

Source: Adapted from Poleksic; Mitrovic-Tutundzic(1994).

HAI value of each fish was calculated based on the following formula: $HAI = 1 \times \Sigma I + 10 \times \Sigma II + 100 \times \Sigma III$, wherein I, II and III correspond to stages I, II and III, respectively. The aforementioned value was based on five categories established by de Poleksic; Mitrovic-Tutundzic (1994), namely: 0-10 = normal tissue function; 11-20 = mild-to-moderate tissue damage; 21-50 = moderate-to-severe tissue alteration; 51-100 = severe tissue alteration; higher than 100 = irreparable tissue damage.

RESULTS AND DISCUSSION

The herein assessed 42 gill fragments presented stage I, II and III alterations (Table 2). Given the similarity observed in alterations recorded for both assessed species, the current study has made the option for jointly presenting and discussing the results.

Table 2. Frequency of gill alterations observed in *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum* specimens from a lake zone in Maranhão State.

Stage	Histological Alterations in Gills	N	Frequency (%)
I	Partial fusion of several lamellae	36	85.71
	Total fusion of several lamellae	36	85.71
	Respiratory epithelium lifting	34	80.95
	Congested blood vessels	32	76.19
	Disorganized lamellae	32	76.19
	Lamellar epithelial hyperplasia	32	76.19
	Blood sinus dilation	28	66.67
	Respiratory epithelium hypertrophy	06	14.29
II	Lamellar epithelium bleeding and rupture	06	14.29
	Total lamellar fusion	04	9.52
	Uncontrolled proliferative tissue thickening	04	9.52

	Chloride cell hyperplasia and hypertrophy	02	4.76
	Mucus cell hyperplasia and hypertrophy	02	4.76
	Pillar cell rupture	02	4.76
III	Cell necrosis and degeneration	04	9.52
	Lamellar aneurysm	01	2.38

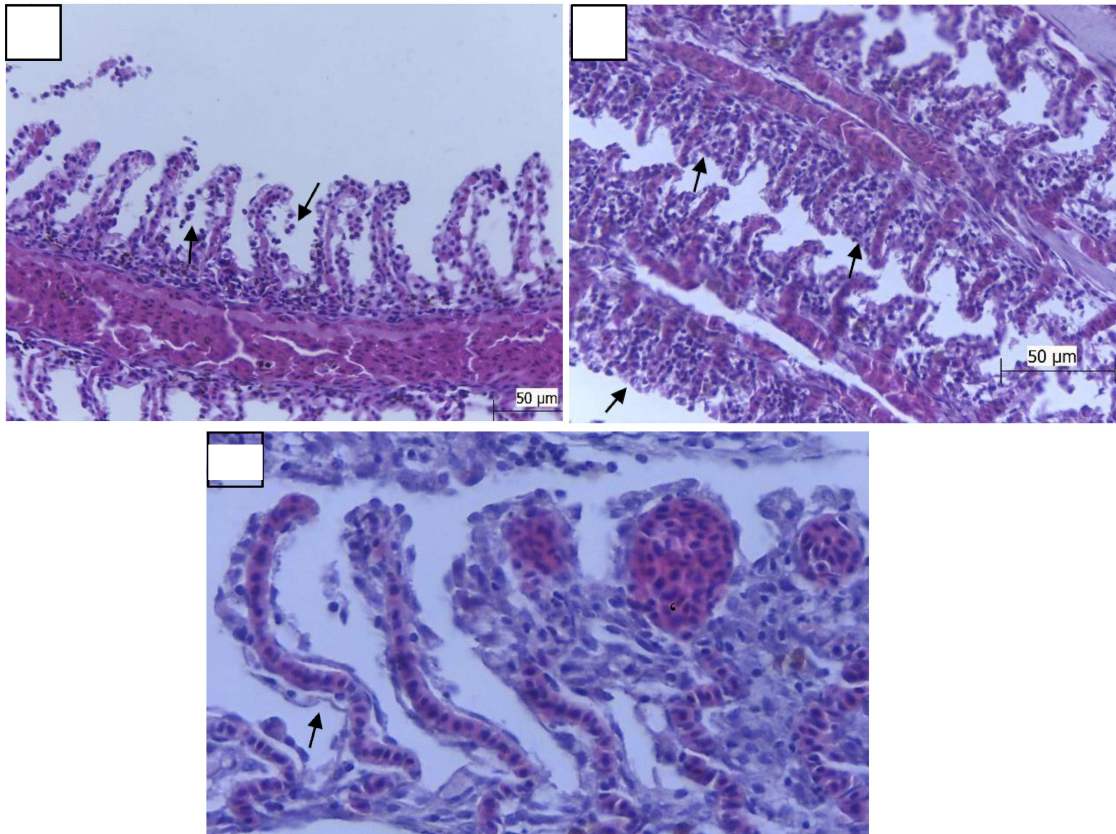
178 Wherein: N= number of fish with gill alterations.

179 The histological analysis allowed seeing several changes at all three severity stages; some
 180 specimens have shown changes at two, or more, stages at the same time. The most
 181 observed Stage-I gill alteration comprised total (n=36/42; 85.71%) and partial (n=36/42;
 182 85.71%) fusion of several lamellae, epithelial lifting (n=34/42; 80.95%), congested blood
 183 vessels (n=32/42; 76.19%), disorganized lamellae (n=32/42; 76.19%) and lamellar
 184 epithelial hyperplasia (n=32/42; 76.19%).

185 The most observed Stage-II alterations comprised lamellar epithelium bleeding and
 186 rupture (n=06/42; 14.29%), total lamellar fusion (n=04/42; 9.52%) and proliferative
 187 tissue thickening (n=04/42; 9.52%). Although stage-II alterations are more severe than
 188 stage-I alterations, they can be reversed, unlike stage-III alterations, which are the most
 189 severe and irreversible ones (POLEKSIC; MITROVIC–TUTUNDZIC, 1994).

190 Cell necrosis and degeneration (n=04/42; 9.52%), as well as lamellar aneurysm
 191 (n=01/42; 2.38%), were the lesions found at stage III. Alterations typical of this stage pose
 192 greater risk to animal health; they can severely compromise organ functioning and gill
 193 breathing. Figure 1 shows some Stage-I, -II and -III gill lesions.

194 Figure 1. Photomicrographs of gill alterations observed in *Hoplerythrinus unitaeniatus*
 195 and *Cichlasoma bimaculatum* specimens from a lake zone in Maranhão State. [A] Lamellar
 196 epithelium rupture (arrows), vasodilation and congestion (asterisks); [B] Secondary
 197 lamellae fusion and lamellar epithelial hyperplasia (arrows); [C] Lamellar aneurysm
 198 (asterisks) and epithelial lifting (arrow). HE staining. 40X objective lens.



Source: Authors' collection.

Physiological responses to stress play key role in the survival of different organisms; they range from neurological reactions to increased plasma cortisol levels. In addition, repeated and chronic exposure to stressors has detrimental effects on many physiological aspects of fish (VIJAYAN; ALURU; LEATHERLAND, 2010). The first physiological reactions taking place in fish gills are observed in gill epithelium, which is an extensive area that enables high level of exposure to aquatic environments and makes fish vulnerable to several stressors (MOKHTAR, 2017).

Histological changes observed during the current study were compatible to lesions previously recorded by other scholars for fish deriving from contaminated environments (MACHADO, 1999; CASTRO et al., 2018). Gill alterations, such as lamellar fusion, edemas and aneurysms, can work as defensive responses by the body to stress caused by impacted environments (PEREIRA et al., 2014). The herein identified alterations can make breathing - which is the basic function of this organ - difficult.

Pereira et al. (2020) have defined gill histological analyses as very effective to assess

215 environmental impacts and fish health. They analyzed gills of *Psectrogaster amazonica*⁵⁴

specimens collected in Mearim River, Bacabal County, Maranhão State, and found stage-I, -II and -III alterations in the assessed samples, with emphasis on the incidence of parasites, which also work as stressor agents.

Cantanhêde et al. (2014) have histologically analyzed the gills of *Centropomus undecimalis* specimens from an impacted lake environment and observed that several samples had moderate-to-severe alterations in this organ, with emphasis on aneurysm, which was found in 30% of the total sample. The aforementioned authors have concluded that some alterations may be reversible if environmental conditions can be improved.

Based on the HAI values herein calculated for gills, 59.52% (n=25/42) of specimens presented normal tissue function; 23.81% (n=10/42) showed mild-to-moderate tissue damage; 4.76% (n=02/42) evidenced moderate-to-severe tissue changes; and, 11.90% (n=05/42), irreparable tissue damage.

Gills are water quality indicators; therefore, changes observed in them may suggest reaction to stress caused by changes in environments fish live in. However, the fact that most specimens presented normal tissue functioning may indicate that environmental stressors were not high to the point of causing severe lesions and of compromising organ functioning in most analyzed fish.

Similar to what was observed for gills, histological liver analyses have shown Stage-I, -II and -III alterations in both *H. unitaeniatus* and *C. bimaculatum* specimens (Table 3). Given the similarity of alterations observed in both species, the current study has made the option for presenting and discussing the results, altogether.

Table 3. Frequency of liver lesions observed in *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum* specimens from a lake zone in Maranhão State.

Stage	Histological Alterations in Liver	N	Frequency (%)
I	Vacuolization	38	90.48
	Melanomacrophage center	33	78.57
	Cell contour deformation	28	66.67

	Nucleus at cell periphery	22	52.38
	Cell hypertrophy	03	7.14
	Nuclear hypertrophy	01	2.38
	Cell atrophy	01	2.38
	Nuclear atrophy	01	2.38
	Hyperemia	19	45.24
	Cytoplasmic degeneration	17	40.48
II	Nuclear vacuolization	09	21.43
	Nuclear degeneration	06	14.29
	Cell disruption	05	11.90
III	Necrosis	04	9.52

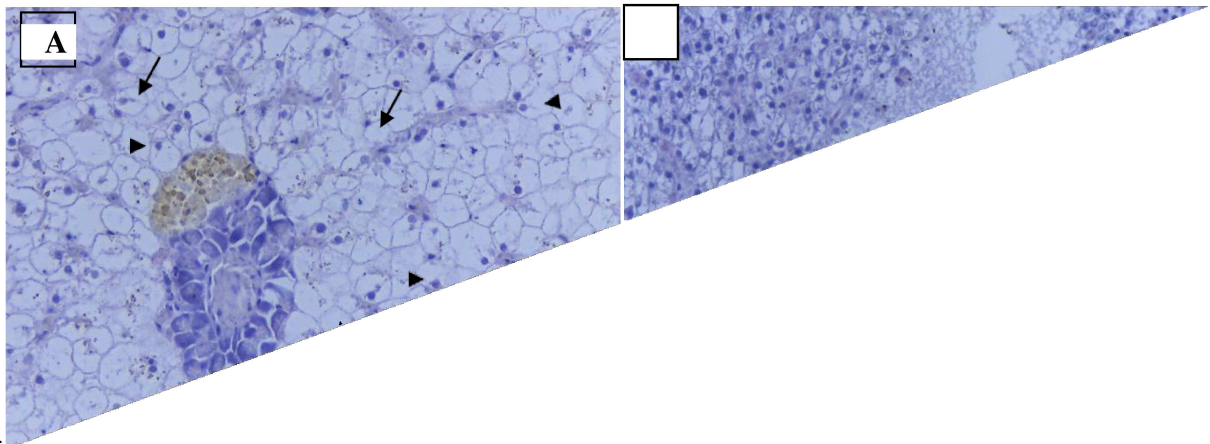
Wherein: N= number of fish with liver alterations.

Some specimens have shown changes at two, or more, stages at the same time. Analyses have confirmed several Stage-I alterations, with emphasis on vacuolization, which was observed in 90.48% (n=38/42) of the assessed specimens. Melanomacrophages center (n=33/42; 78.57%), cell contour deformation (n=28/42; 66.67%) and nucleus at cell periphery (n=22/42; 52.38%) were the other alterations mostly observed during the analyses.

Hyperemia (n=19/42; 45.24%), cytoplasmic degeneration (n=17/42; 40.48%) and nuclear vacuolization (n=09/42; 21.43%) were the main alterations observed at Stage II. Necrosis (n=04/42; 9.52%), which is the only stage-III alteration, was also identified throughout the current study. Similar to what was observed for gills, Stage-III liver alteration is the one posing the greatest risk to animal health, since it can severely compromise the liver function.

Other changes that were not described in the severity stages established by Poleksic; Mitrovic-Tutundzic (1994), such as fatty degeneration (n=06/42; 14.29%), inflammatory process (n=06/42; 14.29%), bleeding (n=02/42; 4.76%), abscess (n=02/42; 4.76%) and evident nucleolus (n=02/42; 4.76%), were also observed in the herein analyzed samples. Some of the observed liver lesions are shown in Figure 2.

Figure 2. Photomicrographs of liver alterations observed in *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum* specimens from a lake zone in Maranhão State. [A] Melanomacrophage center (asterisk), vacuolization (arrows) and nucleus at cell periphery (arrowheads); [B] Necrotic areas in the liver parenchyma (arrows). HE staining. 40X objective lens.



Source: Authors' collection.

Liver has multiple functions, such as bile production, nutrient assimilation, plasma protein synthesis, vitamin and glycogen storage, as well as toxic substances' biotransformation (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009). Making energy available for processes involved in actions against stress is one of the responses associated with liver function; in these cases, the liver is recruited to release glycogen (in other forms) into the blood stream (SCHRECK; TORT, 2016).

Liver shows high trend to accumulate chemical substances, such as heavy metals, due to its physiology (LATIF et al., 2021). Changes in the liver, such as vacuolization and increased incidence of melanomacrophages centers, may suggest that the investigated animal may have been exposed to contamination (RICHARDSON et al., 2010). Therefore, this organ is susceptible to alterations resulting from stressors' action.

Histological analysis of *Oreochromis niloticus* liver carried out by Oliveira et al. (2016), who also analyzed gills, has evidenced changes, such as necrosis and melanomacrophage center, similar to the ones observed in the present study. The aforementioned authors have also emphasized that the liver was the organ presenting the most severe lesions - their samples were also collected in lake environment. Likewise, Leone; Valdecantos;

Martínez (2018) have analyzed histopathological markers of environmental stress in *Odontesthes bonariensis* specimens living in impacted environments and observed that the liver was the most affected organ. It presented changes similar to the ones observed in the current study, such as necrosis and melanomacrophages' accumulation.

Based on the calculated HAI values, 26.19% (n=11/42) of the analyzed specimens presented normal liver functioning; 26.19% (n=11/42) presented mild-to-moderate liver damage; 38.09% (n=16/42) showed moderate-to-severe liver damage; and 9.52% (n=04/42) presented irreparable liver damage. Unlike HAI values recorded for gills, HAI values recorded for liver have shown better balanced rates among severity classifications, with emphasis on the highest rate (38.09%), which corresponded to moderate-to-severe tissue alterations. This outcome has suggested that the liver was more affected by the action of stressors than the gills.

Soares et al. (2020) have concluded that fish's gills and liver presented different responses to stress. On the other hand, they stated that gills were the most affected organ, since they presented the most significant alterations. According to Sager et al. (2021), gills were the organs mostly sensitive to short-term exposure to the investigated contaminant; they also observed that liver was the most sensitive organ in the long run. Results have also shown alterations in both organs in 40 fish specimens.

300300

301

CONCLUSIONS

Histological analyses applied to the gills and liver of both herein investigated neotropical fish species enabled observing several histological alterations that may have resulted from animals' interactions with stressful agents. Some samples presented severe lesions capable of compromising the functioning of the assessed organs. Overall, lesions observed in the liver were more severe than the ones observed in gills. This outcome can be explained by liver's function of accumulating substances and by the time animals remained exposed to stressors.

309

310

REFERENCES

311 BOMBONATO, M. T. S. et al. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus*

- 312 *macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringa , v.29, n. 1, p. 81-85, nov.
 313 2007. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v29i1.157>
- 314 BOYD, C. E. General Relationship Between Water Quality and Aquaculture Performance in
 315 Ponds. In: JENEY, G. **Fish diseases: prevention and control strategies**. [S. L.]: Elsevier,
 316 2017. p. 147-166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804564-0.00006-5>
- 317 CANTANHE DE, S. M. et al. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de
 318 *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque
 319 Ecológico Laguna da Jansen, São Luís - MA. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**
 320 e **Zootecnia**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 593-601, abr. 2014. [http://dx.doi.org/10.1590/1678-](http://dx.doi.org/10.1590/1678-41626348)
 321 41626348
- 322 CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. Técnicas histológicas. In:
 323 MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R (Org.). **Conceitos e métodos**
 324 **para formação de profissionais em laboratório de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, cap.
 325 3, p. 89-187, 2010.
- 326 CASTRO, J. S. et al. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii*
 327 (Siluriformes, Ariidae) capturados no Complexo Estuarino de São Marcos,
 328 Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 70, n. 2,
 329 p. 410-418, mar. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9906>
- 330 DE JESUS, G. dos S. et al. Qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais
 331 utilizadas para fins de pesca artesanal em Comunidade Quilombola Maranhense. In:
 332 CASTRO, A. C.; CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. V. (Org.). **Meio ambiente e a outra**
 333 **economia dos povos e comunidades tradicionais**. Guarujá: Científica Digital, 2022. p.
 334 61-72.
- 335 DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The toxicology of fishes**. Boca Raton: Crc Press, 2008.
 336 1096 p. <https://doi.org/10.1201/9780203647295>
- 337 DIGIULIO, R. T.; NEWMAN, M. C. Ecotoxicologia. In: KLAASSEN, C. D; WATKINS III, J. B.
 338 **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: Amgh, 2012. p.
 339 391-399.

- 340 GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of Fish Histology**. Boca Raton: Crc
341 Press, 2009. 224 p. <https://doi.org/10.1201/9780367803599>
- 342 KOPPEN, W. **Climatologia**: com un estudio de los climas de la tierra. México: Fondo de
343 Cultura Economica, 1948. 478 p.
- 344 LATIF, F. et al. Studies on bioaccumulation patterns, biochemical and genotoxic effects of
345 copper on freshwater fish, *Catla catla*: an in vivo analysis. **Brazilian Journal Of Biology**,
346 [S.L.], v. 84, p. 1-11, out. 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256905>
- 347 LEONE, O.; VALDECANTOS, S.; MARTÍNEZ, V. Marcadores histopatológicos de estrés
348 ambiental en el pez *Odonthestes bonariensis* (Atheriniformes, Atherinopsidae) en dos
349 embalses de Argentina. **Uned Research Journal**, Sabanilla, v. 10, n. 2, p. 273-282, set.
350 2018. <http://doi.org/10.22458/urj.v10i2.1909>
- 351 MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas.
352 **UNOPAR Científica**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, out. 1999.
- 353 MANAHAN, S. E. **Environmental chemistry**. 10. ed. Boca Raton: Crc Press, 2017. 752 p.
354 <https://doi.org/10.1201/9781315160474>
- 355 MOKHTAR, D. M. **Fish Histology**: from cells to organs. New York: Apple Academic Press,
356 2017. 264 p. <https://doi.org/10.1201/9781315205779>
- 357 NOGA, E. J. **Fish disease**: diagnosis and treatment. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010.
358 536 p. <https://doi.org/10.1002/9781118786758>
- 359 OLIVEIRA, S. R. S. de. et al. Lesões histopatológicas como biomarcadores de contaminação
360 aquática em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes, Cichlidae) de uma área protegida no
361 Maranhão. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, [S. L.], v. 9, n. 1, p. 12-26, jul.
362 2016.
- 363 PEREIRA, D. P. et al. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus*
364 (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na Laguna da Jansen, São
365 Luís, MA (Brasil). **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 30, n. 4, p. 1213-1221, jul. 2014.

- PEREIRA, N. J. et al. Biomarcadores histológicos em brânquias de peixes na avaliação da contaminação ambiental do rio Mearim, nordeste brasileiro / histological biomarkers in fish gills in the assessment of environmental contamination of the Mearim river, northeastern Brazil. **Brazilian Journal Of Development**, Curitiba, v. 6, n. 9, p. 68063-68079, set. 2020. <http://doi.org/10.34117/bjdv6n9-297>
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on fresh water fish**. Oxford: Fishing News Books, cap. 30, p. 339-352, 1994.
- RICHARDSON, N. et al. The use of liver histopathology, lipid peroxidation and acetylcholinesterase assays as biomarkers of contaminant-induced stress in the Cape stumpnose, *Rhabdosargus holubi* (Teleostei: sparidae), from selected South African estuaries. **Water Sa**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 407-415, ago. 2010. <http://doi.org/10.4314/wsa.v36i4.58409>
- ROCHA, R. M. et al. Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (CASTELNAU, 1855) baía do Guajará, Belém, Pará. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 101-109, abr. 2010. <http://doi.org/10.5216/cab.v11i1.3028>
- SAGER, E. et al. Multibiomarker responses in *Danio rerio* after exposure to sediment spiked with triclosan. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 1-18, 2021. <http://doi.org/10.1590/0001-3765202120201938>
- SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. In: SCHRECK, Carl B. et al (Ed.). **Biology of Stress in Fish**. [S. L.]: Elsevier, 2016. Cap. 1. p. 1-34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>
- SOARES, S. H. C. et al. Biomarcadores histológicos em *Sciades herzbergii* (Pisces, Ariidae) para avaliação de impactos em ambientes estuarinos da Baía de São Marcos, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 72, n. 4, p. 1403-1412, ago. 2020. <http://doi.org/10.1590/1678-4162-11701>
- STICKNEY, R. R. **Aquaculture: an introductory text**. 3. ed. Wallingford: Cabi, 2017. 337 p. <http://dx.doi.org/10.1079/9781786390097.0000>

- 395 TORT, L. Impact of Stress in Health and Reproduction. In: FARRELL, A. P. (ed.).
396 **Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment.** [S. L.]: Academic Press,
397 2011. p. 1541-1552. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00191-X>
- 398 VIJAYAN, M. M.; ALURU, N.; LEATHERLAND, J. F. Stress Response and the Role of Cortisol.
399 In: LEATHERLAND, J. F.; WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish Diseases and Disorders, Volume 2:**
400 **Non-infectious Disorders.** 2. ed. Wallingford: Cabi, 2010. Cap. 6. p. 182-201.
401 <https://doi.org/10.1079/9781845935535.0182>

CAPÍTULO IV

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da realização dessa pesquisa foi possível observar diversas alterações histológicas em brânquias e fígado de *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Cichlasoma bimaculatum* oriundos de uma área lacustre no município de Anajatuba, que faz parte da Baixada Maranhense, no estado do Maranhão. Com isso, foi viável afirmar que a sanidade dos animais amostrados foi afetada negativamente.

As alterações encontradas sugerem uma reação do organismo dos peixes a estressores, com algumas lesões encontradas no estágio III da classificação de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). Estas lesões são consideradas graves e com danificação irreparável do tecido, podendo estar comprometendo a função do órgão afetado. Além disso, os resultados obtidos são similares aos de outras pesquisas realizadas em ambientes impactados.

Apesar de não ter sido possível identificar a causa específica do estresse aos peixes, é necessário uma averiguação mais precisa sobre os fatores responsáveis por impactar essa região e causar estresse nesses animais, já que diversos estudos comprovaram a depreciação ambiental da área da Baixada Maranhense. Além do mais, é preciso estabelecer até que ponto, além da saúde animal e ambiental, a saúde humana está sendo afetada pelos problemas ambientais e de sanidade dos peixes.

Embora órgãos como a Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Pesca (SAGRIMA), a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED), a Agência Estadual de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Maranhão (AGERP), o Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR) e a Secretaria de Estado da Agricultura Familiar (SAF) e a UEMA, a Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) realizarem orientações técnicas, incentivo à produção e inserção em atividades de comercialização em todo estado, pode estar ocorrendo uma falha em algum destes processos, sendo necessário um monitoramento mais efetivo em relação ao ambiente e à sanidade de peixes e de outros organismos aquáticos da região.

Espera-se que o presente estudo contribua com o fortalecimento da pesca e aquicultura maranhense, estimulando a consciência ambiental de pescadores, piscicultores e habitantes dessa região através de palestras realizadas por órgãos, entidades e pesquisadores, assim como a realização de mais projetos na área. Com base nas funcionalidades propostas nesta pesquisa, sugere-se para trabalhos futuros:

- Determinação e pesquisa de bioacumulação de substâncias químicas nos tecidos e órgãos dos animais aquáticos dessa região lacustre.
- Determinação e pesquisa de metais pesados em água oriunda dessa região lacustre.
- Realização de testes de toxicidade e observação de alterações metabólicas em organismos aquáticos vivos dessa região lacustre.
- Investigação sobre o destino final de efluentes de residências, fazendas e indústrias dessa área lacustre e regiões circunvizinhas.
- Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos nos organismos aquáticos dessa região lacustre.

ANEXO

Anexo 1. Normas para Submissão Revista Acta Veterinaria Brasilica

Guide for authors

1. Types of articles

The manuscripts must be original and may be the result of research, clinical cases, short communication, abstracts and works from annals events. These latter two types can only be submitted after contact and previous agreement with the Editorial Board of this journal.

The articles resulting from research work must be theoretically well-founded and their execution must follow scientific methodology and justified for the proper goals.

All the papers involving the use of animals, regardless of its species, must present the approval number by the Ethics Committee from the institution of origin of the work, in the body of the submitted manuscript, and the copy of the document which proves such approval must be attached as supplemental document during submission. For omitted cases, please, consult the Editorial Board of this journal before initiating the submission process.

All the papers involving human beings must present the approval number by the Ethics Committee in Research ("CEP") in the body of the submitted manuscript and the copy of the document which proves such approval must be attached as supplemental document during submission.

1.1. Scientific Article

It is the full report of an experimental work. It's based on the premise that the results are subsequent to the planning of research;

Text sections: Title, Authors and Filiation, Abstract, Keyword, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (or Results and Discussion), Conclusions, Acknowledgements (if applicable) and References;

The authors' names must be placed in full below the title, followed by numbers which will be repeated for the institution specification to which they are affiliates, indicating the corresponding author (informing the e-mail). In the submitted article's first version, the authors' names and their respective filiations must be omitted. They must only be added in the manuscript's final version and the journal's metadata at the time of submission;

The abstract must contain, at least, 100 words and, at most, 250 words. The number of keywords is from 3 to 5, and must not repeat the ones contained in the title. The keywords must come separated by semicolons;

The total of pages must not exceed the number of 20 (text editor format), including tables, charts and figures;

It is suggested that the references are, mostly, updated, that is, published at least in the last four years. It is recommended the non-use of references of books, handouts and web sites. The references from simple or expanded abstracts and complete works in annals of events are, in many occasions, of difficult retrieval. Hence, we suggest that this kind of source is not used as reference. Regarding the thesis, dissertations and monographs, we request that only documents from the last four years are used, and when the respective scientific paper published in a journal does not exist.

We recommend a maximum of 6 (six) authors per submitted manuscript. If this number is superior to the recommended, we request that the coordinator of the team or the first author, send at the item "comments to the editor", justification for such situation. It will be the editorial team's responsibility to decide whether the conduct of this manuscript, in these situations, will occur normally.

1.2. Case report

Reporting the occurrence of clinical cases when it is not frequent in the city/region/country or species, or the reports about such in literature are scarce;

Text sections: Title, Authors and Filiation, Abstract, Keyword, Introduction, Sample Case Report, Discussion and Conclusions, Acknowledgements (if applicable) and References;

The authors' names must be placed in full below the title, followed by numbers which will be repeated for institution specification to which they are affiliates, indicating the corresponding author (informing the e-mail). In the submitted article's first version, the authors' names and their respective filiations must be omitted. They must only be added in the manuscript's final version, after accepted for publication, and journal metadata at the time of submission;

The abstract must contain, at least, 100 words and, at most, 250 words. The number of keywords is from 3 to 5, and must not repeat the ones contained in the title.

The total of pages must not exceed the number of 10 (text editor format), including tables, charts and figures;

It is suggested that the references are updated, that is, published at least in the last four years. It is recommended the non-use of references of books, handouts and web sites. The references from simple or expanded abstracts and complete works in annals of events are, in many occasions, of difficult retrieval. Hence, we suggest that this kind of source is not used as reference. Regarding the thesis, dissertations and monographs, we request that only documents from the last four years are used, and when the respective scientific paper published in a journal does not exist.

We recommend a maximum of 6 (six) authors per submitted manuscript. If this number is superior to the recommended, we request that the coordinator of the team or the first author,

send at the item "comments to the editor", justification for such situation. It will be the editorial team's responsibility to decide whether the conduct of this manuscript, in these situations, will occur normally.

1.3. Short communication

A concise way, but with complete description of a punctual or ongoing (preliminary note) research, with bibliographic documentation and complete methodology, as a regular scientific article;

Text sections: Title, Authors and Filiation, Abstract, Keyword, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (or Results and Discussion), Conclusions, Acknowledgements (if applicable) and References;

The authors' names must be placed in full below the title, followed by numbers which will be repeated for institution specification to which they are affiliates, indicating the corresponding author, informing the e-mail. In the submitted article's first version, the authors' names and their respective filiations must be omitted. They must only be added in the manuscript's final version, after accepted for publication, and journal metadata at the time of submission;

The abstract must contain, at least, 100 words and, at most, 250 words. The number of keywords is from 3 to 5, and must not repeat the ones contained in the title.

The total of pages must not exceed the number of 8 (text editor format), including tables, charts and figures;

It is suggested that the references are updated, that is, published at least in the last four years. It is recommended the non-use of references of books, handouts and web sites. The references from simple or expanded abstracts and complete works in annals of events are, in many occasions, of difficult retrieval. Hence, we suggest that this kind of source is not used as reference. Regarding the thesis, dissertations and monographs, we request that only documents from the last four years are used, and when the respective scientific paper published in a journal does not exist.

We recommend a maximum of 6 (six) authors per submitted manuscript. If this number is superior to the recommended, we request that the coordinator of the team or the first author, send at the item "comments to the editor", justification for such situation. It will be the editorial team's responsibility to decide whether the conduct of this manuscript, in these situations, will occur normally.

1.4. Abstracts and Annals Events

The norms must obey the ones established by the scientific committee of the event in question and can only be submitted after contact and previous agreement with the Editorial Board of this journal.

2. General Observations (valid for all sections)

Language: the papers can be submitted in Portuguese or English; however, those written in Portuguese must be translated to English after the manuscript is accepted. Only manuscripts written in English along with a translation certificate will be published. All the norms of orthography and grammar currently in effect for this language must be adopted thoroughly. In case of authors non-native of these languages, the article must be edited by a company providing this service or native in that language and the proof of linguistic revision must be sent at the time of submission through the "Transfer of Supplementary Documents" field. We recommend the following companies:

- <http://www.proof-reading-service.com>;
- <http://www.academic-editing-services.com/>;
- <http://www.publicase.com.br/formulario.asp>;
- <http://www.journalexperts.com>;
- <http://www.webshop.elsevier.com/languageservices>;
- <http://wsr-ops.com>;
- <http://www.journaleditorsusa.com>;
- <http://www.queensenglishediting.com/>;
- <http://www.editage.com.br/manuscriptediting/index.html>;
- <http://www.canalpage.com>;
- <http://www.stta.com.br/servicos.php>;
- <http://americanmanuscripteditors.com/>.

The Acta Veterinaria Brasilica points out that the articles submitted in English, with language certification review, will have priority on the processing, considering the requirements regarding the process of internationalization of scientific journals recommended by important indexing bases.

- **Formatting:** Articles must be presented in compatible file with the text editor program, preferably Microsoft Word (DOC or RTF format). The page size must be A4 (210 x 297 mm) with margins of 2.5 cm. The text must be typed in line spacing 1.5, Times New Roman font, normal style, size 12 and paragraph without indentation, with space between paragraphs. Pages and lines must be numbered; the pages numbers must be placed in the inferior margin, centralized and the lines must be numbered in a continuous way;

- **Tables:** It is preferred with portrait orientation. They will be numbered consecutively with Arabic numerals in the superior part. Do not use vertical lines. Horizontal lines must be used to separate the header title from the content, besides one in the end of the table. Each data must occupy a distinct cell. Do not use bold or capital letter in the header. It is recommended that tables present 8.2 cm in width, not superior to 17 cm;
- **Figures:** Charts, photographs, photomicrography, diagrams, org charts or drawings will be denominated in general as Figure succeeded by crescent Arabic numeration and label in the superior part. After the illustration, at the bottom, indicate the source consulted (mandatory element, even if it is the author's own production), legend, notes and other information necessary for their understanding (if any). The illustration should be quoted in the text and inserted as close as possible to the section to which it refers. One must use software compatible with Microsoft Windows to prepare charts. Resolution must have maximum quality with at least 300 dpi. Figures must present 8.5 cm in width, not superior to 17 cm. Times New Roman must be the font used, body 10 and do not use bold in the axis identification. Tables and figures must be inserted right after their first citation in the text.
- **Equations:** they must be typed using the Equation Editor of Word, with Times New Roman font. The equations must receive a crescent Arabic numeration and present the following size pattern: Entire = 12 pt Subscripted/superscript = 8 pt Subsubscripted/superscript = 5 pt Symbol = 18 pt Sub-symbol = 14 pt. These definitions are found in the equation editor of Word.
- **Metadata:** The metadata may not be altered after initiating the processing whatsoever, that is, it will not be possible to add new authors' name after initiating the processing or acceptance of manuscripts.

3. Fees

In the act of submission it is required the payment of a SUBMISSION FEE in the amount of R\$ 150.00 (one hundred and fifty reais) non-refundable, which must be paid via Federal Tax Liability Payment Form (GRU Simples; this amount will not be deducted from the final cost of the published and accepted article for publication. The author must digitalize the GRU tab and the bank receipt of payment to attach them in "Documentos Suplementares", at the Acta Veterinaria Brasilica web page. They must also send the vouchers to the e-mail of Acta Veterinaria Brasilica (avb.ufersa@gmail.com) informing the ID (four first numbers), generated at the time of submission and the title of the article. The authors must make the payment and send the appropriate proofs AT THE SUBMISSION ACT, under penalty of immediate rejection

of the article submitted. Noting that payment of the submission fee does not imply that your work will be published in this journal. If the submission has all the documents required, inserted in the system, it will undergo a preliminary evaluation of the Editorial Committee, where it can be accepted for beginning of the process, blind peer evaluation, among other processes, until final editorial decision. The submission fee will not be reimbursed (and there will be no reimbursement) in case of filing and / or cancellation of the manuscript submission that is submitted outside the standards and guidelines recommended by the Editorial Board;

After the round(s) of evaluation(s) and, in case of the manuscript has the final editorial acceptance, the authors responsible for the manuscript shall proceed with the payment of the PUBLICATION FEE in the amount of R\$ 250.00 (two hundred and fifty reais) per article within 30 (thirty) days from the communication of the acceptance. Payments must be made via "GRU simples" and must follow the same system of communication to this Editorial Board. If this payment is not made or communicated, within the period stipulated above, the procedure will be closed and the manuscript archived;

Guidelines for the issuance and payment of the "GRU simples" (Submission Fee and Publication Fee) are available on the "Emissão de GRU (GRU Issuance)" icon in the navigation bar of the Acta Veterinaria Brasilica.

4. References

The bibliographic citations in the text will be made by the author and year system. E.g. With 1 (one) author, use Torres (2008) or (TORRES, 2008); with 2 (two) authors, use Torres; Marcos Filho (2002) or (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); with 3 (three) authors, use França; Del Grossi; Marques (2009) or (FRANÇA; DEL ROSSI; MARQUES, 2009); with more than three, use Torres et al. (2002) or (TORRES et al., 2002). In case of two works are not distinguished by these elements, the differentiation will be made by adding lower case letters to the year, in both.

The reference to personal communication and non-published data must be made in the text itself, in parentheses, with citation of name(s) or author(s). The list of references must include only selected bibliography at work and that has served as a source for direct consultation.

The list of references must be alphabetically ordered by first author's surname, registering the names of all authors, except when superior to three authors, the title of each publication and, in full, the periodic or work's name, using the current norms of the Brazilian Association of Technical Standards - ABNT.

RULES FOR AUTHOR ENTRY

Until 3 (three) authors

All the names are mentioned, in the order they appear in the publication, separated by semicolons.

E.g. TONETTI, A.; BIONDI, D. Dieta de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) em ambiente urbano, parque municipal tingui, Curitiba-PR. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 9, n. 4, p. 316-326, 2016.

More than 3 (three) authors

Only the first name is mentioned, adding the expression et al.

E.g. GONÇALEZ, P. O. et al. Lobação e distribuição intraparenquimal da artéria hepática em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 9, n. 4, p. 301-305, 2016. Degree of kinship HOLANDA NETO, J. P. Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN. 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

COSTA SOBRINHO, João da Silva. Cultura do melão. Cuiabá: Prefeitura de Cuiabá, 2005.

REFERENCES MODELS:

a) Articles of journals: crucial elements:

AUTHOR. Title of the article. Title of the journal, Place of publication (city), volume No, issue No, initial-final pages, month (abbreviated), year.

E.g. GONÇALEZ, P. O. et al. Lobação e distribuição intraparenquimal da artéria hepática em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 9, n. 4, p. 301-305, 2016.

b) Books or handouts: must be referenced in the following way:

AUTHOR. Title: subtitle. Edition. Place (city) of publication: Publisher, date,. Number of pages or volumes. (name and serial number)

E.g. RESENDE, M. et al. Pedologia: base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa, MG: NEPUT, 1997. 367 p. OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. Geologia do Brasil. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

c) Books or handouts, partly (Book chapter):

AUTHOR OF THE CHAPTER. Title of the chapter. In: AUTHOR OF THE BOOK. Title: subtitle of the book. Edition number. Place of publication (city): Publisher, date. Indication of the volume, chapter or pages of the initial-final part.

E.g. BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). Melhoramento e produção do milho. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

d) Dissertations and Theses: (only recent citation will be allowed, PUBLISHED IN THE LAST THREE YEARS PRIOR TO THE WRITING OF THE ARTICLE). It is referred to the

following way: AUTHOR. Title: subtitle. Year of presentation. Number of sheets or volumes. Category (degree and area of concentration) - Institution, place.

E.g. OLIVEIRA, F. N. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). 2011. 81 f. Dissertação (Mestrando em Fitotecnia: Área de Concentração em Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2011.

e) Articles from Annals or Abstracts : (MUST BE AVOIDED) NAME OF THE CONGRESS, No., year, venue (city). Title... subtitle. Place of publication (city): Publisher, date of publication. Number of pages or volumes.

E.g. BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3., 1978, Manaus. Anais... Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

f) Literature not published, mimeographed, typewritten etc.:

E.g. GURGEL, J. J. S. Relatório anual de pesca e piscicultura do DNOCS. Fortaleza: DNOCS, 1989. 27 p. Datilografado.

g) Literature which authorship is one or more legal entities:

E.g. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS. NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

h) Literature without authorship:

E.g. NOVAS Técnicas – Revestimento de sementes facilita o plantio. Globo Rural, São Paulo, v. 9, n. 107, p. 7-9, jun. 1994.

i) Cartographical document:

E.g. INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO (São Paulo, SP). Regiões de governo do Estado de São Paulo. São Paulo, 1994. 1 atlas. Escala 1:2.000.

j) Electronically (CD and Internet): the documents/exclusive access information by the computer (online) are composed by the following crucial elements for your reference: AUTHOR. Denomination or title and subtitle (if applicable) of the service or product, indication of responsibility, electronic address between the symbols < > preceded by the expression - Available from: - and the date of access preceded by the expression - Access on:.

E.g. BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. SNPC – Lista de Cultivares protegidas. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM. In case of doubts, send your question to avb.ufersa@gmail.com.