

**TOLERÂNCIA DE LAMBARIS (*Bryconops caudomaculatus*)
SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA**

MAYARA DA CRUZ RIBEIRO

Chapadinha

2014

MAYARA DA CRUZ RIBEIRO

**TOLERÂNCIA DE LAMBARIS (*Bryconops caudomaculatus*)
SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador (a): Prof. Dra. Jane Mello Lopes

Co-orientador (a): Prof. Dr. Sandro Estevan Moron

Chapadinha

2014

Ribeiro, Mayara da Cruz

Tolerância de lambaris (*Bryconops caudomaculatus*) submetidos a diferentes concentrações de amônia / Mayara da Cruz Ribeiro – Chapadinha, 2014.

68 f.

Orientador: Prof^a. Dr^a Jane Mello Lopes

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Maranhão, Curso Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

1. Alterações 2. Brânquias 3. Histologia 4. Morfologia I.Título

CDU 639.3.05

MAYARA DA CRUZ RIBEIRO

**TOLERÂNCIA DE LAMBARIS (*Bryconops caudomaculatus*) SUBMETIDOS A
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 06 /03 /2014

BANCA EXAMINADORA



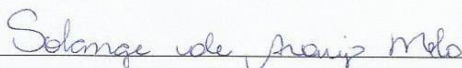
Prof. Dra Jane Mello Lopes (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron (Co-orientador)
Universidade Federal do Tocantins



Prof. Dr. Marcos Antonio Delmondes Bomfim
Universidade Federal do Maranhão



Prof. Dra Solange de Araujo Melo
Universidade Estadual do Maranhão

*“Sabemos que todas as coisas cooperam para
o bem daqueles que amam a Deus,
daqueles que são chamados
segundo o seu propósito.”
(Romanos 8:18)*

*Dedico primeiramente a Deus,
seu amor me inspira e me dá força.
A Celso Luiz, meu esposo e amigo.
Aos meus pais, Carlos Magno e Raimunda,
Minha Vó Linda Francisca, meus irmãos e família,
seu amor e carinho, alegam minha vida.
E aos meus amigos, do que seria a vida sem amigos.*

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Jane Mello Lopes, pelos conselhos, incentivos, pelas brigas e por sempre estar ao meu lado em todas as dificuldades que enfrentamos até aqui.

Ao meu co-orientador Sandro Estevan Moron, pelos conselhos, parceria e ensinamentos que me proporcionaram crescer em conhecimento e como pessoa.

Aos professores que participaram da minha formação no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMA, Alana Aguiar, Felipe Ribeiro, Henrique Parente, Jorge Luiz Nunes, Livio Junior. E aos meus mestres, Ivan Sampaio, Marcos Antonio Delmondes Bomfim e Neila Lidiany Ribeiro, professores que marcaram minha vida, pois além dos ensinamentos em aula, me ensinaram lições para a vida. Para todos os outros professores, que passaram pela minha vida acadêmica, compartilhando seus conhecimentos e me ajudando no meu crescimento profissional e humano.

Aos meus pais Carlos Magno e Raimunda Maria pelo amor, apoio e incentivo sempre, em todas as minhas batalhas. Aos meus irmãos Paula e Junior pela amizade e carinho constante.

Ao meu esposo Celso Luiz, pelo amor, compreensão e sempre me apoiar e incentivar com gestos e carinho constante.

Aos meus sobrinhos, amo muito vocês. A minha amiga Aline pelos conselhos nas horas difíceis. A minha irmã de coração Cássia Betânia, que sempre me ajudou nas dificuldades.

Aos amigos que fiz nessa trajetória, Benta Figueiredo, Brenda Ferreira, Elis Regina, Erika Amaral, Jayne Barros, Gilselle Luz, Jeffesson Lima, Laiane Sousa, Laís Abreu, Laiza Lacerda, Liana Bezerra Dias de Lima, Nadia Regina Stefanine e Pamyliuk Matos, que com paciência e carinho, ajudaram a vencer vários desafios.

A todos os funcionários e colegas da UFT e da UFMA, em especial, agradeço ao José de Ribamar, Ribamar Aranha e Silvia Maria Silva, pela ajuda e por estarem presentes com pequenos gestos, me apoiando no dia a dia.

A família Pêssego, em especial a Senhora Matilde e seus filhos Lucivam, Maria, Sandra, Diego, Edivan, que me acolheram em Araguaína/TO, com bondade e carinho.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado Antônio José de Lima, Aldilene Lima, Ariel Coelho, Carlos Eduardo de Lima, Clemeson Cardoso Vale, Diego Amorim dos Santos, Flavio Oliveira Souza, Ivan Hudson Cassimiro Lino, Karlyene Sousa da Rocha, Marcio Luiz da Silva, Mayanna Karlla Costa, Melise Lopes, Sandra Paula Gasparini e Xerxes Tosta. Agradeço pelas várias noites e dias de estudo, pelos conselhos e amizade que tornaram esta caminhada mais fácil.

Ao Grupo Pescado, pela troca recíproca de ajuda e conhecimento, em especial a: Rebekah Sousa, Gustavo André, Camila Vieira, Alice Ferreira, Ariana Almeida, Patricia Normandes, Cleidiane Andrade, jovens guerreiros com os quais tive a satisfação de conviver.

Aos animais que participaram deste experimento, que me possibilitaram a realização e conclusão do mesmo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão (FAPEMA), à Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e à Universidade Federal do Tocantins (UFT), por proporcionarem o desenvolvimento e conclusão deste.

A todos aqueles que me ajudaram direta e indiretamente.

Do fundo do meu coração...

Obrigada.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
CAPÍTULO I	
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 A Espécie: Lambari (<i>Bryconops caudomaculatus</i>).....	18
2.2 Toxidez da Amônia (NH ₃).....	19
2.3 Alterações Causadas pela Amônia.....	20
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.1 Objetivos Específicos.....	21
4 REFERÊNCIAS.....	22
CAPITULO II – ANÁLISES HISTÓLOGICAS NAS BRANQUIAS DE LAMBARIS <i>Bryconops caudomaculatus</i> (GUNTHER, 1864) EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA	
Resumo.....	27
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	31
Conclusão.....	35
Agradecimentos.....	35
Literatura Citada.....	36

CAPITULO 3 – Histopatologias do fígado de lambaris *Bryconops caudomaculatus* (Gunther, 1864), expostos a concentrações de amônia.

Resumo.....	39
Abstract.....	40
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	42
Resultados e Discussão.....	45
Conclusão.....	51
Agradecimento.....	51
Comitê de Ética e Biossegurança.....	51
Referências.....	51
ANEXO 1: NORMAS DA REVISTA REFERENTES AO CAPITULO 2...	58
ANEXO 2: NORMAS DA REVISTA REFERENTES AO CAPITULO 3...	63
CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

®	Registrado
µm	Micrômetro
ATP	Adenosina Trifosfato
CL	Concentração Letal
cm	Centímetro
et al.	Entre outros
g	Grama
HE	Hematoxilina – Eosina
L	Litro
LM	Lamela Primária
LS	Lamela Secundária
mg L ⁻¹	Miligrama por litro
mm	Milímetro
NH ₃	Amônia não ionizada
NH ₄ CL	Cloreto de Amônia
°C	Grau Celsius
p<	Menor que
pH	Potencial hidrogeniônico
TO	Tocantins
v	Versão

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2		Páginas
Tabela 1	Parâmetros de qualidade da água durante o período experimental.....	31
Tabela 2	Alterações histopatológicas das brânquias de lambari <i>B. caudomaculatus</i> expostos a concentrações de amônia não ionizada.....	32
Tabela 3	Largura das lamelas secundárias das brânquias de <i>B. caudomaculatus</i> exposto a NH ₃	36
CAPITULO 3		
Tabela 1	Parâmetros de qualidade da água durante o período experimental (96h).....	45
Tabela 2	Frequência das histopatologias no fígado de <i>B. caudomaculatus</i> expostos a concentrações de amônia não ionizada (NH ₃).....	48

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1	Páginas
Figura 1 Juvenil de <i>Bryconops caudomaculatus</i>	18
 CAPITULO 2	
Figura 1 Fotomicrografia das LS de <i>Bryconops caudomaculatus</i> . (a) Controle (0,003mg.L ⁻¹): LS com normalidade; (b) Trat. 0,15mg.L ⁻¹ : LS com hipertrofia; (c) Trat. 0,30mg.L ⁻¹ : hipertrofia (seta), congestão do epitélio lamelar (estrela); (d)Trat. 0,50 mg.L ⁻¹ : hiperplasia das LS; (e)Trat. 0,50 mg.L ⁻¹ : aneurisma, com ruptura epitelial; (f)Trat. 0,50 mg.L ⁻¹ : hipertrofia (seta) e edema (estrela); (g e h) Trat.1,0 mg.L ⁻¹ : deslocamento epitelial (seta), fusão das lamelas, com focos de necrose. Azul de toluidina. 100x.....	34
 CAPITULO 3	
Figura 1 Fotomicrografia dos fígados de <i>Bryconops caudomaculatus</i> (A) Tratamento 1: (controle) sem alterações expressivas, degeneração vacuolar com aumento de glicogênio; (B)Tratamento 2: Área afetada com pigmentação endógena (seta), infiltrado inflamatório (estrela); (C)Tratamento 3: Dilatação da parede epitelial do capilar; (D)Tratamento 3: Enraizamento com proliferação das células de Kupffer, dilatação dos sinusóides; (E)Tratamento 4: Congestão do capilar (estrela), presença de linfócitos (seta); (F)Tratamento 5: Necrose, desorganização hepatológica. Coradas com HE. 400x.....	48

RESUMO

A diversidade das oscilações no ambiente aquático pode ser intensificada pela falta de metodologias preventivas no manejo. A falta de conhecimento a respeito dos parâmetros de qualidade de água, como transparência, alcalinidade, dureza, oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito e poluentes, causa vários problemas. A elevação na concentração da amônia causa toxicidade para os organismos aquáticos, pois interage com os parâmetros biológicos e pode ser intensificada pela falta de um manejo adequado na água. Animais expostos a esses contaminantes podem sofrer alterações nos processos metabólicos, imunológicas, fisiológicas, lesões teciduais e nos órgãos-alvo como brânquias e fígado. O lambari (*Bryconops caudomaculatus*) é uma espécie nativa com potencial para piscicultura, com grandes possibilidades de expansão, tem alta proliferação, ciclo curto de produção, aceita alimento artificial e serve de alimento para outras espécies. A falta de informação e a demanda por conhecimento sobre os distúrbios causados nesses animais pelo aumento das concentrações de amônia na água exigem estudos mais específicos nesses órgãos-alvo. O objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos da exposição de amônia não ionizada (NH₃) em juvenis de *Bryconops caudomaculatus*, e as alterações histopatológicas e morfológicas nas brânquias e no fígado. Foram utilizados 150 juvenis de lambaris submetidos a cinco tratamentos, em triplicata, com concentrações de NH₃ (mg L⁻¹): controle 0,003 ± 0,4; 0,15 ± 0,5; 0,30 ± 0,3; 0,50 ± 0,5; 1,00 ± 0,4. Após o período experimental foram coletados 12 animais de cada tratamento, para a obtenção das brânquias e do fígado. Após, os órgãos-alvo passaram pelos processos fixação, desidratação, diafranização e inclusão em parafina. A técnica de coloração utilizada foi a Azul de Toluidina para brânquias e a Hematoxilina-Eosina para o fígado. Foi utilizada análise de variância para os dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis para as análises descritivas. Observou-se alterações morfológicas nas lamelas secundárias nas brânquias a partir de 0,15mg L⁻¹, como hiperplasia, hipertrofia, deslocamento epitelial, fusão lamelar, edemas, aneurisma lamelar com ruptura do epitélio e aumento na largura das lamelas. Houve presença também de histopatologias no fígado a partir de 0,30 mg L⁻¹ como congestão nos capilares, processos inflamatórios, pigmentação endógena e no tratamento com maior concentração os hepatócitos apresentaram necrose. Essas alterações causadas pelos processos de intoxicação prejudicaram as funções vitais, metabolização, os processos de respiração e desintoxicação do organismo, hematopoiese e provavelmente na osmorregulação.

Palavras-chave: alterações, brânquias, fígado, histologia, morfologia.

ABSTRACT

The diversity of the oscillations in the aquatic environment can be enhanced by the lack of preventive methods in management. The lack of knowledge about the parameters of water quality, such as transparency, alkalinity, hardness, dissolved oxygen, pH, ammonia, nitrite and pollutants cause various problems. The increase in the concentration of ammonia causes toxicity to aquatic organisms as it interacts with the biological parameters and can be intensified by the lack of appropriate management in water. Animals exposed to these contaminants may change in metabolic, immunologic, physiologic, and tissue damage in target organs such as gills and liver processes. The tetra (*Bryconops caudomaculatus*) is a native species with potential for aquaculture, with great potential for expansion, have high proliferation, short production cycle, accepts artificial food and serves as food for other species. The lack of information and the demand for knowledge about the disturbances caused by these animals increased concentrations of ammonia in the water require more specific studies in these target organs. The objective of this experiment was to evaluate the effects of exposure of un-ionized ammonia (NH₃) in juvenile *Bryconops caudomaculatus*, and morphological and histopathological changes in the gills and liver. 150 juvenile minnows subjected to five treatments in triplicate with concentrations of NH₃ (mg L⁻¹) were control 0.003 ± 0.4; 0.15 ± 0.5; 0.30 ± 0.3; 0.50 ± 0.5; 1.00 ± 0.4. After the experimental period, 12 animals from each treatment were collected to obtain the gills and liver. After, target organs passed by fixation, dehydration, and paraffin embedding diafranização processes. The staining technique used was toluidine blue for gills and hematoxylin-eosin for the liver. Analysis of variance was used for parametric data and Kruskal-Wallis test for the descriptive analyzes. Morphological changes were observed in the secondary lamellae in the gills from 0.15 mg L⁻¹ as hyperplasia, hypertrophy, epithelial displacement, lamellar melt, edema, aneurysm rupture lamellar epithelium and increase in width of the lamellae. There was also the presence of liver histopathologies from 0.30 mg L⁻¹ as the capillary congestion, inflammation, pigmentation and endogenous treatment with the highest concentration in hepatocytes showed necrosis. These changes caused by the processes of intoxication impaired vital functions, metabolism, processes of respiration and detoxification of the body, probably in hematopoiesis and osmoregulation.

Keywords: change, gills, liver histology, morphology.

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil contempla boas condições para o desenvolvimento sustentável da Aquicultura, podendo se tornar uma potência, competindo com produtores importantes como a Índia, Noruega e até a China. As atividades de pesca e aquicultura obtiveram um grande aumento em relação aos anos anteriores, com produção de 160 milhões de toneladas em 2013. A produção aquícola alcançou cerca de 70 milhões de toneladas, o que representa 44% da produção total de peixes e 49% do pescado para consumo humano direto. A receita das exportações atingiu mais de 35 milhões de dólares, ultrapassando os ganhos (ONU, 2014).

No ambiente natural, as oscilações na qualidade da água são ocasionadas pela ação da chuva, material orgânico e inorgânico. Em processo produtivo os resíduos que impactam o meio ambiente podem vir do escoamento agrícola, adubos, fertilizantes, decomposição da alimentação artificial, podendo provocar problemas dependendo do tipo e intensidade da produção. Devido a isso, é necessário estabelecer técnicas de manejo produtivo de forma eficiente e ecologicamente responsável (RANDALL; TSUI, 2002; PEREIRA; MERCANTE, 2005).

As condições físicas e químicas do solo e da água determinam o sucesso da piscicultura. Vários fatores determinam a qualidade da água de um viveiro como temperatura, oxigênio dissolvido, transparência, pH, alcalinidade, dureza e a concentração de resíduos metabólicos, principalmente amônia e nitrito, assim como de outras substâncias nocivas, como poluentes em geral (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

Estes fatores interferem no funcionamento e na homeostase do sistema fisiológico dos organismos aquáticos, influenciando decisivamente no desenvolvimento dessa atividade. É indispensável conhecer os fatores limitantes de cada espécie, em relação aos compostos nitrogenados, que são perigosos para os sistemas aquáticos de cultivo intensivo (CAMPOS et al., 2012).

Boas práticas de manejo são necessárias para melhorar a qualidade da água e diminuir a quantidade de poluentes. O manejo alimentar, o controle do tempo de retenção da água com sistema de recirculação ou de renovação da água, a taxa de lotação de peixes nos viveiros, são práticas simples na produção, que podem interferir na quantidade de compostos nitrogenados, como a amônia (BOYD; QUEIROZ, 2001).

A elevação da concentração de amônia não ionizada (NH_3) no ambiente, pode indicar aumento da toxicidade em peixes, resultado da interação com outros parâmetros, como o pH e o oxigênio dissolvido. Este metabólito apresenta variações no decorrer do dia devido a atividade microbiana, que ocorre no sedimento da água, e depende da intensidade dos processos de fotossíntese e respiração que ocorrem no ambiente. Elevados níveis de amônia ambiental podem influenciar na retenção da amônia metabólica do sangue a qual se torna tóxica e por consequência, gera alterações na fisiologia dos animais expostos (REIS; MENDONÇA, 1999; ARANA, 2010).

O conhecimento sobre a toxicidade da amônia não ionizada auxilia na determinação dos níveis prejudiciais para espécies aquáticas. É um indicativo importante para determinar alterações nos parâmetros de qualidade da água e nas alterações fisiológicas, sendo influenciada pela espécie, tamanho e idade do indivíduo (PIEDRAS et al., 2006).

Algumas importantes hipóteses formuladas para explicar os mecanismos de toxidez da amônia foram sumarizadas por Ruffier et al. (1981), onde o desequilíbrio da osmorregulação provoca falhas nos rins, diminuição do processo de excreção da amônia produzida pelo organismo, disfunção citológica e neurológica e dano no epitélio branquial que provoca a asfixia do animal.

No Brasil os níveis máximos permitidos de amônia na forma não-ionizada em viveiros é de 0,02 mg/L (CONAMA, 2005) e para nitrogênio total devem estar entre 2,0 a 3,0mg/L (BOYD; TUCKER, 1998). Animais expostos a esses contaminantes podem ter alterações metabólicas, como neurotoxicidade, infertilidade, distúrbios imunológicos, desenvolvimento e inibição da capacidade reprodutiva, distúrbios genéticos, susceptibilidade a doenças, entre outros efeitos que podem levar à morte, além de ser um problema para o desenvolvimento dos sistemas produtivos (SUSKI et al., 2007).

A carência de informações a cerca desta problemática gera uma maior demanda por conhecimentos dos distúrbios causados pelo aumento das concentrações da amônia na forma não-ionizada. A evidência dos limites de tolerância para as diferentes espécies é importante para a verificação dos distúrbios fisiológicos e histopatológicos causados nos animais afetados. Esses distúrbios podem causar prejuízos no desenvolvimento zootécnico, na conversão alimentar, no crescimento, na reprodução, no equilíbrio ecológico e no desempenho de forma geral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Espécie: Lambari (*Bryconops caudomaculatus*)

Na produção aquícola, há espécies identificadas como nobres, com mercado estabelecido, mais também existem espécies consideradas secundárias na criação comercial de peixes. A família Characidae é composta de espécies secundárias conhecidas como lambari, tetra, piaba ou tambuí, sendo encontrados em pequenos riachos, lagos e em grandes rios formadores das bacias hidrográficas de todo o ambiente tropical (GARUTTI, 2003; COSTA-PEREIRA; SEVERO-NETO, 2012).

Destaca-se pela fácil aceitação de alimentação artificial, alta proliferação, ciclo curto de produção, sendo bem aceito como petisco e bastante procurado como isca para a pesca esportiva. Também é uma espécie utilizada para o consumo humano ou para alimentação de outras espécies de aquáticas (PORTO-FORESTI et al., 2010).

Entre as diversas espécies nativas com potencial para piscicultura, o lambari possui um mercado específico, porém com grandes possibilidades de expansão. O lambari tem recebido maior atenção por parte dos piscicultores por ser uma espécie rústica, de pequeno porte, com ciclo de vida rápido e que apresenta elevada produtividade em cultivo intensivo. Seu cultivo pode ter início em qualquer época e se processa da forma mais natural possível, apenas com o emprego adequado de técnicas de manejo (CHERNOFF; MACHADO-ALLISON, 2005).

O *Bryconops caudomaculatus* (Gunther 1864), é a espécie mais complexa e numerosa da família (Figura 1), ocorrendo nas regiões costeiras da Guiana e bacias do rio Amazonas no Brasil, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela, constituindo um importante item alimentar de espécies piscívoras (CÂMARA et al., 1991; SILVA et al., 2008).



Figura 1: Juvenil de *Bryconops caudomaculatus*.

2.2 Toxidez da Amônia (NH₃)

Atualmente a toxicologia aplicada aos estudos com animais de produção está em amplo desenvolvimento. Toda substância química é capaz de produzir efeito nocivo em um sistema biológico, sendo considerada como um agente tóxico, dependendo das condições de exposição: concentração, duração, frequência, via de exposição, além das propriedades físico-químicas do agente e a suscetibilidade individual (RIGHI et al., 2008).

Em cultivo é comum ocorrerem oscilações das variáveis ambientais, como os níveis de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza e compostos nitrogenados, principalmente amônia e nitrito, o que muitas vezes, pode causar grande mortalidade dos peixes e problemas aos produtores. A água de má qualidade leva os peixes ao estresse, afetando sua sobrevivência e seu crescimento e tornando-os mais sensíveis às enfermidades em geral. Pelo fato da amônia ser o principal composto nitrogenado excretado pelos animais aquáticos, problemas com toxidez podem ocorrer em todos os tipos de sistemas de cultivo (FERREIRA, 2008).

A toxicidade pode se referir ao potencial de uma dada substância e seu efeito nocivo a um organismo vivo. A partir deste dado é possível estimar a concentração tolerável para o crescimento da espécie e o nível máximo de amônia na água sem prejudicar os processos biológicos e o seu desenvolvimento (TOMASSO, 1994; MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

A alimentação de peixes em confinamento apresenta elevados níveis de proteínas (aminoácidos). Os compostos nitrogenados que são eliminados e o nitrogênio contido nestes resíduos podem ser excretados como nitrogênio orgânico (excretas) ou inorgânico (amônia), que é a principal forma de excreção de nitrogênio dos peixes. A adição de fertilizantes, como o sulfato de amônio, e adubos orgânicos, assim como a decomposição do alimento não consumido pode aumentar o teor dos compostos nitrogenados em viveiros de piscicultura (SANTOS; OBA, 2009).

O termo amônia total pode ser representado como $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ e se refere à soma de ambas as formas de amônia. A amônia não ionizada é representada como NH_3 , enquanto a forma ionizada é representada pelo NH_4^+ . Há o incremento da toxidez da amônia quando há baixas concentrações de oxigênio dissolvido (ARANA, 2010).

A concentração relativa de NH_3 se eleva com o aumento da temperatura e do pH e diminui com o aumento da salinidade em sistemas de cultivo com altas densidades e podem alcançar níveis que comprometem o desenvolvimento da atividade (WAJSBROT et al, 1993).

A exposição de níveis tóxicos de NH_3 tem sido relatada em vários estudos envolvendo peixes de água doce, sofrendo variações entre as diferentes espécies, idade, sexo e grau e intensidade de exposição (TOMASSO, 1994; ATWOOD et al, 2000; EL-SHAFI et al, 2004; BOLNER, 2007; MIRON et al., 2011). Níveis acima de 0,3 mg/L podem ser letais para peixes de água doce (PERSON-LE RUYET et al., 1995).

2.3 Alterações Causadas pela Amônia

Estudos de toxicidade utilizando peixes permitem avaliar seus efeitos através dos danos teciduais, obtendo informações importantes correspondentes aos efeitos causados na biota de determinado ecossistema, em ambiente natural (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2000). A amônia é um poluente comum ao meio aquático e é expressivamente tóxica para esses organismos. Entre as variáveis que influenciam a qualidade da água, a amônia é descrita como um dos parâmetros mais limitantes à sobrevivência e o crescimento dos organismos aquáticos (ISMIÑO-ORBE et al., 2003; ARANA, 2010).

Em sistemas de produção intensiva, a produção contínua de resíduos nitrogenados, especialmente amônia e nitrito, podem atingir níveis bastante elevados. É de suma importância obter um manejo eficiente, controlando e respeitando os níveis seguros, de acordo com a sensibilidade, idade e especificação para cada espécie (MIRON et al., 2011).

A exposição à amônia inibe o crescimento dos animais aquáticos, além de promover alterações no sangue e em vários órgãos vitais como brânquias, rins e fígado. Sendo o principal composto nitrogenado excretado pelos peixes, a amônia é eliminada principalmente pelas brânquias, sendo que o rim colabora com menos de 2% da excreção de amônia total dos teleósteos (WOOD, 2001; DAS et al., 2004).

As alterações histológicas em peixes são utilizadas como biomarcadores dos estressores ambientais sinalizando respostas à exposição de agentes tóxicos. Essa categoria de biomarcadores tem a vantagem de permitir o exame de órgãos-alvo e células específicas em animais expostos a poluentes (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2002).

Um dos primeiros órgãos afetados pelos poluentes e o principal para absorção de contaminantes são as brânquias. Atuam como órgãos-alvo dos peixes para os contaminantes, uma vez que tem extensa superfície e estão em contato direto com o meio ambiente externo (SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2007; ARANA, 2010).

As brânquias são divididas em quatro arcos branquiais de cada lado da faringe e estes, por sua vez, são formados por duas fileiras de filamentos branquiais, onde ficam as lamelas branquiais. As lamelas são formadas por células pilares e cobertas por uma membrana basal e o epitélio, que é contínuo com o do filamento e é constituído por uma camada interna de células pavimentosas (BALDISSEROTTO, 2009).

O fígado é um órgão-alvo importante, pois em condições normais, produz parte da NH_3 , seguido do músculo esquelético, rins e brânquias. Altos níveis de amônia reduzem o pH sanguíneo devido ao acúmulo de metabólitos ácidos provocando edemas e fusão das lamelas nas brânquias e nos processos de osmorregulação (EVANS et al., 2005; WALSH et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Expor juvenis de *Bryconops caudomaculatus*, a diferentes concentrações de amônia não ionizada na água (NH_3) e observar possíveis alterações nas brânquias e no fígado.

3.2 Objetivos Específicos

- 1.** Avaliar os efeitos da exposição de amônia não ionizada na sobrevivência de juvenis de lambari *Bryconops caudomaculatus*;
- 2.** Avaliar alterações morfológicas e histológicas nas brânquias de juvenis de lambari submetidos a concentrações de amônia não ionizada;
- 3.** Analisar possíveis alterações histológicas do fígado de juvenis de lambari submetidos a concentrações de amônia não ionizada.

4 REFERÊNCIAS

- ARANA, L.V. **Qualidade da água em aquicultura: Princípios e Práticas**. 3.ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2010.
- ATWOOD, H.L. et al., Brain monoamine concentrations as predictors of growth inhibition in channel catfish exposed to ammonia. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.12, p.69-73, 2000.
- BALDISSEROTTO, B., **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2.ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Brasil: Ed. UFSM, 2010. p.101–115.
- BOLNER, K.C.S. **Parâmetros metabólicos e íons plasmáticos de piavas (*leporinus obtusidens*) expostas a diferentes níveis de oxigênio dissolvido e amônia**. 2007. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Programa de pós-graduação em Biodiversidade Animal - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- BOYD, C. E., QUEIROZ, J. F., Feasibility of retention structures, settling basins, and best management practices in effluent regulation for Alabama Channel catfish farming. **Reviews in Fisheries Science**, v. 9, issue 2, p. 43-67, 2001.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. **Water quality and pond soil analyses for aquaculture**. Auburn: Auburn University, 1992.
- CÂMARA, J. J. C.; RODRIGUES, A. M.; CAMPOS, E. C.; SANTOS, R. A.; MANDELLI, J. Pesca seletiva do tambicú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), com a utilização de redes de malha, na represa de Ibitinga, rio Tietê, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, n.18, p.51-60, 1991.

CAMPOS, B. R.; MIRANDA-FILHO, K. C.; D'INCAO, F.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (LATREILLE, 1817) (CRUSTACEA: DECAPODA). *Atlântica*, Rio Grande, v.34, n.1, p.75-81, 2012.

CHERNOFF, B.; MACHADO-ALLISON, A. *Bryconops magoi* and *Bryconops collettei* (Characiformes: Characidae), two new freshwater fish species from Venezuela, with comments on *B. caudomaculatus* (Gunther). *Zootaxa*, n. 1094, p.1-23, Dec. 2005.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº357, de 17 de março de 2005**. Publicada no DOU nº053, de 18/03/2005, p.58-63.

COSTA-PEREIRA, R.; SEVERO-NETO, F. Dining out: *Bryconops caudomaculatus* jumps out of water to catch flies. *Revista Chilena de História Natural*, n.85, p.241-244, 2012.

DAS, P.C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J.K.; DAS, B.K. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Research*, v.35, p.134-143, 2004.

EL-SHAFI, S.A.; EL-GOHARY, F.A.; NASR, F.A.; STEEN, N.P.V.D.; GIJZEN, H.J. Chronic ammonia toxicity to duck weed fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.232, n.1-4, p.117-127, Jul., 2004.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-base Regulation and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiology Review*, v.85, p.97-177, 2005.

FERREIRA, F.W. **Sobrevivência e crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) expostos a diferentes níveis de amônia, oxigênio e Ca²⁺ na dieta e na água**. 2008. 91 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2008.

GARUTTI, V. **Piscicultura Ecológica**. ed. UNESP, p.330. 2003.

ISMÍÑO-ORBE, R.A.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M; GOMES, L.C. Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1243-1247, 2003.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Org.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, 2002. p.551– 577.

MIRON, D. S., BECKER, A. G., LORO, V. L., BALDISSEROTTO, B. Waterborne ammonia and silver catfish, *Rhamdia quelen*: survival and growth. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p. 349-353, 2011.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; BELGER, L.; PELLETIER, É.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*), **Environmental Research**, v.90, p.217–225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C.; ROULEAU, C. Comparative gill damages and bioaccumulation of inorganic mercury on tropical and nordic fish. **Environmental Research**, v.83-A, p.286–292, 2000.

ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. **FAO: Pesca e aquicultura batem recorde de produção em 2013**. Disponível em:<<https://www.fao.org.br/cgpanr.asp>>. Acesso em: 27 mar. 2014.

PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.31, n.1, p.81-88, 2005.

PERSON-LE RUYET, J.; CHARTOIS, H.; QUEMENER, L. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. **Aquaculture**, v.136, p.181–194, 1995.

- PIEDRAS, S. R. N.; OLIVEIRA, J. L. R.; MORAES, P. R. R. M.; BAGER, A. Toxicidade aguda da amônia não ionizada e do nitrito em alevinos de *Cichlasoma facetum* (JENYNS, 1842). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.5, p.1008-1012, 2006.
- PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) In:
- RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v.45, p.17-23, 2002.
- REIS, J.A.T.; MENDONÇA, A.S.F. Amônia em efluentes e mananciais de água doce - Uma avaliação dos limites impostos pelo CONAMA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA AMBIENTAL, 20., 1999. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 1999.
- RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S.; PALERMO-NETO, J. **Toxicidade Aplicada à Medicina Veterinária**. Ed. MANOLE, Barueri, SP. p.942, 2008.
- RUFFIER, P.; BOYLE, W.; KLEINSCHMIDT, J. Short-term acute bioassay to evaluate ammonia toxicity and affluent standards. **Journal Water Pollution Control Federation**, n.53, p.367-377, 1981.
- SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; BENZE, T. P.; FERNANDES, M. N. Distribuição de células mucosas nas brânquias de *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus*, coletados no reservatório da UHE de Furnas (MG).. In: I SIMPÓSIO DE ECOLOGIA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2007, São Carlos. **Anais...** São Carlos, 2007. p. 237-243.
- SANTOS, L.R.B.; OBA, E. T. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**, Embrapa Amapá, 2009.

SILVA, C. C., FERREIRA, E. J. G., DEUS, C. P. Diet of *Bryconops alburnoides* and *B. caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) in the region affected by Balbina Hydroelectric Dam (Amazon drainage, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, n. 6(2), p. 237-242, 2008.

SUSKI, C.D.; KIEFFER, J.D.; KILLEN, S.S.; TUFTS, B.L. Sub-lethal ammonia toxicity in largemouth bass., **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146-A, p.381–389, 2007.

TOMASSO, J.R. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. **Reviews in Fisheries Science**, v.2, n.4, p.291-314, 1994.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p.171-193.

WAJSBROT N.; GASITH A.; DIAMANT A.; POPPER D.M. Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. **Journal of Fish Biology**, v. 42, p.321-328, 1993.

WALSH, P.J.; VEAUUVY, C.M.; MCDONALD, M.D.; PAMENTER, M.E.; BUCK, L.; WILKIE, M.P. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147-A, p.332–343, 2007.

WOOD, C. M. Toxic responses of the gill. In: SCHELENK, D.; BENSON, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. London, Ed. Organs Taylor e Francis, 2001, p.1-89.

CAPITULO II

ANÁLISE HISTOLÓGICA NAS BRÂNQUIAS DE LAMBARIS *Bryconops caudomaculatus* (GUNTHER, 1864), EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA

RESUMO

Poucos são os estudos em teleósteos dulcícolas sobre as alterações morfológicas das brânquias em relação à toxicidade da amônia. Neste contexto para avaliar possíveis alterações branquiais em lambaris, 150 animais ($16,27\text{g} \pm 1,35$ e $11,41 \pm 0,3\text{cm}$) foram submetidos a diferentes concentrações de amônia não-ionizada NH_3 : 0,003 (controle); 0,15; 0,30; 0,50 e 1,0 (mg L^{-1}) por 4 dias (96h). Posteriormente foram separados aleatoriamente 12 animais por tratamento, para retirada das brânquias e observação das alterações. Em seguida foram feitos os processos de fixação, desidratação e diafranização, seguida da inclusão das amostras em parafina. A coloração usada foi o Azul de Toluidina para as observações em microscópio de luz. Os resultados foram submetidos à análise descritiva, onde foram examinados a ocorrência e grau das alterações, e para as análises estatísticas, os dados foram transformados em números para o teste de Kruskal-Wallis. A exposição dos lambaris às concentrações de amônia não-ionizada acima de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ promoveram alterações nas brânquias como hiperplasia, fusão e hipertrofia do epitélio lamelar. Observou-se também edemas, deslocamento epitelial, dilatação e congestão dos capilares, aneurismas, hemorragias, a presença de necroses e alterações causadas pelos processos de intoxicação. Concluiu-se que a amônia não ionizada causou sérias alterações nas lamelas branquiais, e que as concentrações acima de $0,30 \text{ mg L}^{-1}$ prejudicaram as funções vitais como os processos de respiração e osmorregulação dos animais expostos.

Palavras-chave: alterações, intoxicação, osmorregulação, respiração, teleósteos.

Histological analysis on gills of minnows *Bryconops caudomaculatus* (Gunther, 1864), exposed to different concentrations of ammonia

ABSTRACT

There are few studies on the morphological changes of the gills in relation to ammonia toxicity in freshwater teleost. In this context to assess possible changes in gill, 150 animals ($16.27 \pm 1.35 \text{ g}$ and $11.41 \pm 0.3 \text{ cm}$) were subjected to different concentrations of un-ionized ammonia NH_3 : 0.003 (control); 0.15; 0.30; 0.50 and 1.0 (mg L^{-1}) for 4 days (96h). Were subsequently randomly assigned 12 animals per treatment to remove the gills and observing the changes. Then was made fixing processes, dehydration and diafranização, followed by the addition of the samples in paraffin. The color used was toluidine blue for light microscope observations. The results were submitted to descriptive analysis, where they were examined the occurrence and degree of change, and for statistical analysis, data were transformed into numbers for the Kruskal-Wallis test. The exposure of minnows at concentrations of un-ionized ammonia above 0.15 mg L^{-1} induced variations in the gills as hyperplasia, hypertrophy and fusion of lamellar epithelium. It was also observed edema, epithelial displacement, dilation and congestion of the capillaries, aneurysms, bleeding, necroses, and the presence of process changes caused by intoxication. It was concluded that the un-ionized ammonia caused serious changes in gill lamellae, and that concentrations above 0.30 mg L^{-1} damaged the vital functions such as respiration and osmoregulation processes of animals exposed.

Keywords: changes, intoxication, osmoregulation, respiration, teleost.

Introdução

O meio ambiente é muito diversificado em relação às alterações que ocorrem em sua composição e estrutura. Ao longo do tempo, a sobrevivência de organismos aquáticos, a estas mudanças, aconteceu pela capacidade de adaptação morfológica e fisiológica, decorrentes de vários estressantes ambientais. As brânquias são estruturas vitais para a saúde dos peixes, pois é o principal local de trocas gasosas, além de auxiliar em processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, excreção de compostos nitrogenados e ainda é um órgão sensorial da gustação (Winkaler et al., 2001; Lopes, 2006; Silva et al. 2012).

As brânquias são formadas por quatro arcos branquiais de cada lado da faringe, e por duas fileiras de filamentos branquiais. As lamelas que se localizam no filamento, são formadas por células pilares e são cobertas por membrana basal e epitélio respiratório. O epitélio é contínuo com o do filamento, e sua espessura tem variação de acordo com o tipo de natação dos peixes (rápida ou lenta). As lamelas são constituídas por duas camadas de células epiteliais, e estas separam a água do sangue circulante, que flui em direção oposta à água, onde ocorrem as trocas gasosas (Fernandes & Mazon, 2003; Baldisserotto, 2009).

Por estarem em contato direto com água e com as alterações físico-químicas ambientais, as brânquias podem sofrer lesões e alterações em sua morfologia, e estas lesões podem interferir na homeostase fisiológica do peixe, comprometendo a sobrevivência destes animais (Fontainhas-Fernandes et al., 2008).

As condições ambientais podem comprometer a integridade estrutural das brânquias, levando a alterações histológicas. Entre as principais lesões estão o edema e hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, infiltração de células epiteliais, fusão lamelar, assim como a morte de células mucosas, devido a longos períodos de hipersecreção de muco. Todas essas alterações são uma resposta defensiva (crônica) a infecções parasitárias, bacterianas ou a irritantes químicos (Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Reis et al., 2009).

Estas lesões provavelmente estão relacionadas à agentes tóxicos, e podem comprometer as trocas gasosas e a osmorregulação. Representam também estratégias adaptativas que o animal desenvolveu para auxiliar e não comprometer as suas funções biológicas (Laurent & Perry, 1991; Miron et al., 2008).

As alterações histológicas nas brânquias de peixes são utilizadas como biomarcadores de estressores ambientais. Essas alterações sinalizam os efeitos e respostas resultantes da exposição de um ou mais agentes tóxicos, assim permitem o exame de órgãos-alvo e células específicas em animais expostos a poluentes (Hinton et al., 1992; Cavichiolo, 2009).

A presença elevada de compostos nitrogenados no meio aquático pode gerar vários problemas fisiológicos e hemolinfáticos. A toxicidade da amônia atua sobre o processo de transporte de oxigênio, transformando hemocianina em metahemocianina, a qual é incapaz de transferir oxigênio para os tecidos (Gross, 2004), podendo gerar alterações nas estruturas de órgãos importantes para a sobrevivência desses animais (Cavero et al., 2004).

Os compostos nitrogenados são considerados como substâncias de pequena toxicidade. Mas em longo prazo, e por ser o produto final da nitrificação, pode gerar a amônia não-ionizada, que se acumula principalmente em sistemas de cultivo fechado, gerando efeitos letais ou sub-letais para diferentes organismos aquáticos, sendo necessário o estudo dos seus efeitos tóxicos para as diferentes espécies de peixes (Campos et al., 2012).

Realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar o efeito da exposição de diferentes concentrações de amônia não-ionizada (NH_3) sobre possíveis alterações histológicas nas brânquias de lambaris (*Bryconops caudomaculatus*).

Material e Métodos

Juvenis de lambari foram coletados na região de Araguaína/TO (Lat. 7°11'31 Sul/ Long. 48°12'28 Oeste) e em seguida foram transportados para o Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins (UFT), onde foram aclimatados durante 30 dias em caixas de 250L com aeração constante e alimentação duas vezes ao dia, com ração comercial (40% de proteína bruta).

Após a aclimação, 150 lambaris ($16,27\text{g} \pm 1,35$ e $11,41 \pm 0,3\text{cm}$), foram distribuídos aleatoriamente em 15 caixas de polietileno (250L), numa densidade de 10 juvenis por caixa, onde permaneceram por quatro dias (96 horas) para o experimento. Os animais foram submetidos a cinco tratamentos, com concentrações de NH_3 (mgL^{-1}): controle $0,003 \pm 0,4$; $0,15 \pm 0,5$; $0,30 \pm 0,3$; $0,50 \pm 0,5$; $1,00 \pm 0,4$, em triplicata.

A concentração de amônia não ionizada foi mantida através da adição de solução de NH_4Cl concentrado (Miron et al., 2011). Foi respeitado o limite de NH_3 para espécie da mesma família, descrito por Porto-Foresti et al. (2010), que relataram mortalidade em concentrações de amônia acima de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$.

Durante o período experimental, foi mantida aeração constante e diariamente foi feita a limpeza das caixas por sifonagem para retirada de resíduos (fezes). A água retirada foi substituída por outra nas mesmas condições do início de cada experimento numa renovação diária de até 40% da água das caixas. Durante o experimento não foi fornecido alimento aos indivíduos e a cada 12 horas as caixas foram revisadas para observar alterações comportamentais como frequência respiratória, natação, canibalismo e para contabilizar a sobrevivência.

As análises do oxigênio dissolvido e da temperatura da água foram efetuadas diariamente com um oxímetro digital (ITT 71440) e o pH foi aferido pelo método de azul de bromofenol. As concentrações de amônia dos respectivos tratamentos foram analisadas segundo Verdouw et al. (1978), e a NH_3 foi calculada segundo Piper et al (1982). A dureza da água por titulometria segundo Greenberg et al. (2005) e o nitrito (Boyd & Tucker, 1992) foram determinados no início e ao final do período experimental apenas para controle.

Após 96 horas de exposição, foram coletados aleatoriamente, 12 animais de cada tratamento e colocados em recipiente contendo água e gelo (5 minutos) a fim de anestesiá-los, para posterior necropsia e coleta das brânquias para as avaliações histológicas e morfológicas. As brânquias foram fixadas em Bouin, e posteriormente passaram pelo processo de desidratação e diafranização para a inclusão em parafina. Foram feitos cortes seriados de 3 mm para a confecção das lâminas e usada a coloração com a técnica de Azul de Toluidina (Junqueira & Junqueira, 1983).

Para as análises nas brânquias, foram escolhidos aleatoriamente em cada lâmina, cinco lamelas primárias (LP), e em cada uma foi feita a observação de 10 lamelas secundárias (LS). As alterações foram classificadas a partir da ocorrência e do grau das lesões. As mensurações foram realizadas em microscópio com régua micrométrica em objetiva superplanocromática de 100 x.

Os resultados das alterações observadas nas brânquias foram submetidas a análise descritiva, onde foram utilizados escores de intensidade das alterações, classificando em: 0 sem alterações visíveis; + leve; ++ moderado; e +++ acentuada (Gad & Rousseaux, 2002; Moron, 2009). Para a análise estatística foram atribuídos números para os escores: 1 para +, 2 para ++, 3 para +++.

Foi realizada ANOVA (Teste de Dunnett), para os dados paramétricos, e aqueles que não apresentaram normalidade (dados de intensidade de lesões histológicas), foram submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis), através do programa estatístico software GraphPad InStat v 3.00 para Windows 95® (GRAPHPAD INSTAT, 1998). Para diferenças significativas, foi considerada a probabilidade de $p < 0,05$.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Tocantins/TO (protocolo número: 23101.000282/2014.16).

Resultados e Discussão

A qualidade da água não diferiu entre os tratamentos durante o período experimental (Tabela 1). Os valores obtidos de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e dureza mantiveram-se dentro da faixa recomendável para o cultivo de peixes da mesma família (Garutti, 2003; Porto-Foresti et al., 2010).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água durante o período experimental.

Parâmetros	0,003 mg L ⁻¹	0,15 mg L ⁻¹	0,30 mg L ⁻¹	0,50 mg L ⁻¹	1,00 mg L ⁻¹
¹ pH	6,3 ± 0,2	6,4 ± 0,1	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,4	6,4 ± 0,3
¹ Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	8,5 ± 0,1	8,7 ± 0,3	8,5 ± 0,6	8,6 ± 0,4	8,5 ± 0,4
¹ Temperatura (°C)	26,2 ± 0,3	26,7 ± 0,6	25,6 ± 0,4	25,6 ± 0,2	26,7 ± 0,1
¹ NH ₃ (mg L ⁻¹)	0,003 ± 0,4	0,15 ± 0,5	0,32 ± 0,3	0,53 ± 0,5	1,05 ± 0,4
*Dureza (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	52,5	54,5	55,5	60,5	60,5
*Nitrito (mg L ⁻¹)	0,075	0,100	0,170	0,250	0,300

¹ Valores de médias e erros padrão $p < 0,05$; * Médias.

Durante o período experimental, houve mortalidade de apenas dois animais no tratamento exposto a 0,50 mg L⁻¹ NH₃, podendo ser atribuída a fatores decorrentes aos indivíduos.

Foi observada no presente estudo diferença significativa (p<0,05) entre os tratamentos, onde as concentrações de amônia não ionizada (0,30, 0,50 e 1,0 mg L⁻¹), evidenciaram maiores níveis de alterações morfológicas, em relação ao tratamento controle (0,003 mg L⁻¹ NH₃). Nestes tratamentos houve a presença de alterações (Tabela 2) como necrose, hipertrofias do epitélio lamelar, hiperplasias, fusão das lamelas secundarias e edemas, corroborando com outros estudos que também evidenciaram essas alterações decorrentes das concentrações de amônia na água (Perry & Gilmour, 2006).

Tabela 2. Alterações histopatológicas das branquiais de *B. caudomaculatus* expostos a concentrações de amônia não ionizada.

ESTÁGIO I	0,003 mg L⁻¹	0,15 mg L⁻¹	0,30 mg L⁻¹	0,50 mg L⁻¹	1,00 mg L⁻¹
Hipertrofia	+	+	++	++	+++
Hiperplasia	+	+	+	+	++
Congestão vascular	+	+	+	++	++
Dilatação capilar	+	+	++	++	++
Deslocamento epitelial	0	+	+	++	++
Constricção capilar	0	0	+	+	+
Fusão lamelar	0	+	+	+	++
Edema	0	+	+	+	+
ESTÁGIO II					
Aneurisma lamelar	0	+	+	+	++
Ruptura Epitelial (hemorragia)	+	+	+	++	++
ESTÁGIO III					
Necrose focal	0	0	+	+	+
0 significa ausente; + leve; ++ moderado; +++ acentuada.					

Alterações morfológicas são os primeiros e mais comuns problemas observados nas brânquias, quando os animais estão expostos a agentes tóxicos. Entre as alterações morfológicas que podem ocorrer no epitélio branquial encontramos a síntese ou destruição de componentes moleculares do sistema de transporte, alterações como hiperplasia, fusão lamelar, hipertrofia, que dificultam as trocas gasosas, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (Cerqueira & Fernandes, 2002; Evans et al., 2005).

Robbins e Cotran (2005) relataram que essas alterações estão relacionadas aos processos de intoxicação, onde a extensão e a gravidade da lesão são proporcionais ao tipo, duração, severidade da agressão e estado fisiológico do animal envolvido.

Neste contexto, nossos resultados são similares (Figura 1) aos de Flores-Lopes e Thomaz (2011), que analisaram as alterações morfológicas das brânquias de *Astianax fasciatus*, quando estes estavam submetidos a um alto nível de degradação ambiental. Foram observadas alterações na estrutura do epitélio lamelar, vacuolização e hiperplasia, além de hipertrofia, fusão, e a ocorrência de aneurismas em várias lamelas secundárias.

Foi observado também a fusão do epitélio lamelar nos tratamentos 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ NH₃, em relação ao grupo controle (0,003 mg L⁻¹ NH₃). A hiperplasia pode levar a fusão entre duas ou mais lamelas secundárias, dificultando as trocas gasosas, diminuindo a área e a eficiência respiratória. Outros estudos também mostraram que a amônia pode gerar lesões causando diminuição da área de superfície branquial. Estas alterações podem reduzir a capacidade de trocas gasosas, e de difusão das brânquias, consequentemente prejudicar os processos vitais de respiração, equilíbrio ácido-básico, osmorregulação e excreção de compostos nitrogenados (Frances et al., 2000; Randall & Tsui, 2006).

Martinez et al., (2004) observando brânquias de *Astianax fasciatus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus*, também evidenciaram, o descolamento do epitélio branquial, hiperplasia celular, pequena quantidade de aneurisma, caracterizado pelo extravasamento de sangue (hemorragia) no interior da lamela e consequente congestão e dilatação dos canais sanguíneos.

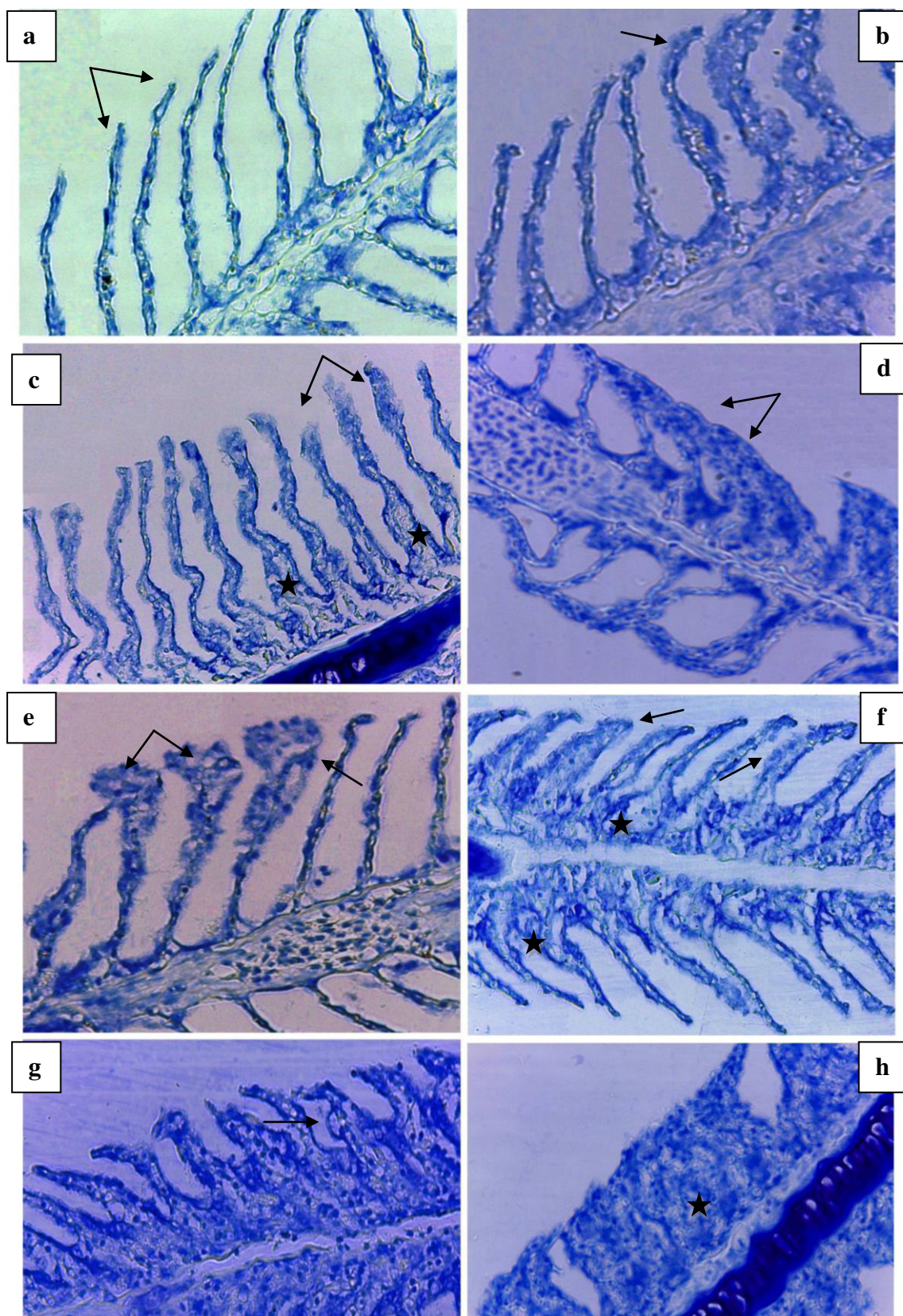


FIGURA 1: Fotomicrografia das LS de *Bryconops caudomaculatus*. (a) Controle ($0,003\text{mg.L}^{-1}$): LS com normalidade; (b) Trat. $0,15\text{ mg.L}^{-1}$: LS com hipertrofia; (c) Trat. $0,30\text{ mg.L}^{-1}$: hipertrofia (seta), congestão do epitélio lamelar (estrela); (d) Trat. $0,50\text{ mg.L}^{-1}$: hiperplasia das LS; (e) Trat. $0,50\text{ mg.L}^{-1}$: aneurisma, com ruptura epitelial; (f) Trat. $0,50\text{ mg.L}^{-1}$: hipertrofia (seta) e edema (estrela); (g e h) Trat. $1,0\text{ mg.L}^{-1}$: deslocamento epitelial (seta), fusão das lamelas, com focos de necrose. Azul de toluidina. 100x

A morfometria das lamelas é um recurso metodológico e taxonômico importante para a análise das brânquias. Fornece dado para fundamentar os danos causados, e auxilia na comprovação das alterações que podem comprometer as funções vitais da espécie estudada (Rocha & Paiva, 2013).

Observa-se na Tabela 3, que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) entre as larguras das lamelas secundárias dos tratamentos com concentração acima de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de NH_3 quando comparados com os grupos de menor concentração (Tabela 3). Provavelmente a diferença esta relacionada às alterações nas branquiais que provocaram alterações no tecido e aumentaram a largura das lamelas.

Tabela 3. Largura das lamelas secundárias das brânquias de *B. caudomaculatus* expostos a NH_3 .

$0,003 \text{ mg.L}^{-1}$	$0,15 \text{ mg.L}^{-1}$	$0,30 \text{ mg.L}^{-1}$	$0,50 \text{ mg.L}^{-1}$	$1,0 \text{ mg.L}^{-1}$
$4,1 \pm 0,20^a$	$4,3 \pm 0,14^a$	$5,2 \pm 0,29^a$	$5,5 \pm 0,28^b$	$5,8 \pm 0,27^b$

*Média e erro padrão. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Conclusão

Concentrações de amônia não ionizada (NH_3) acima de $0,30 \text{ mg L}^{-1}$, promoveram alterações relevantes na estrutura morfológica das brânquias de *Bryconops caudomaculatus*, como hiperplasia, hipertrofia, deslocamento epitelial, fusão lamelar, edemas, aneurisma lamelar com ruptura do epitélio e alterações que causaram aumento significativo na largura das lamelas secundárias, dificultando as funções vitais como os processos de respiração e provavelmente osmorregulação.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Maranhão/UFMA, a Universidade Federal do Tocantins/UFT e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão/FAPEMA.

Literatura Citada

- Baldisserotto, B. 2009. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 2ª Ed, Santa Maria, Ed. UFSM. 352p.
- Boyd, C.E. & Tucker, C.S. 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn University, Auburn. 183p.
- Campos, B. R., Filho, K. C. M., D1incao, F., Poersch, L. & Wasielesky, W. 2012. Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Decapoda), Atlantica, Rio Grande. 34(1): 75-81.
- Cavero, B. A. S., Pereira-Filho, M., Bordinhon, A. M., Fonseca, F. A. L., Ituassú, D. R., Roubach, R. & Ono, E. A. 2004. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 39(5): 513-16.
- Cavichiolo, F. 2009. Histologia: Ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In: Tavares-Dias, M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. (recurso eletrônico). Ed. Macapá: Embrapa Amapá, Macapá. 23: 602-624.
- Cerqueira, C. C. C. & Fernandes, M. N. 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 52: 83-91.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Peres, H., Lim, C. & Klesius, P. H. 2005. No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed heat-treated and non-heat-treated raw soybean meal. Aquaculture Nutrition. 11:123-129.
- Fernandes, M. N. & A. F. Mazon. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A. L. & B. G. Kapoor (Eds.). Fish adaptations. Enfield, Science Publishers. 203-231.
- Figueiredo-Fernandes A., Ferreira-Cardoso J.V., Garcia-Santos S., Monteiro S.M., Carrola J., Matos P. & Fontainhas-Fernandes A. 2007. Histopathological changes in liver and Gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinária Brasileira. 27:103-109.
- Flores-Lopes, F. & Thomaz, A. T. 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. Brazilian Journal of Biology. 71(1):179-188.
- Fontainhas-Fernandes A., Luzio A., Garcia-Santos S., Carrola J. & Monteiro S. 2008. Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water. Brazilian Archives of Biology Technoogy. 51:1057-1063.

- Frances, J., Nowak, B. F. & Allan, G. L. 2000. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*. 183:95-103.
- Gad, S. C. & Rousseaux, C. G. 2002. Use and Misuse of Statistics as an aid in Study Interpretation. Pp. 1:327-418. In: *Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek W. M., Rousseaux, C. G. and Wallig, M. A. eds.), Academic Press, San Diego.
- Garutti, V. *Piscicultura Ecológica*. 1ª ed. UNESP. 69P. 2003.
- GRAPHPAD INSTAT. 1998. Instat guide choosing and interpreting statistical tests, version 3.00. San Diego, 1998. Available from: <http://www.graphpad.com> (10/08/2013).
- Greenberg, G.; Hasson, D.; Semiat, R. 2005. Limits of RO recovery imposed by calcium phosphate precipitation. *Desalination and the Environment*, 183: 273-288.
- Gross, A. 2004. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *Journal of the aquaculture society*. 35(3): 315-321.
- Hinton, D. E., Baumann, P. C., Gardner, G. R., Hawkins, W. E., Hendricks, J. D., Murchelano, R. A., Okihino, M. S. 1992. Histopathologic Biomarkers. In: Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle, Jr. P. M., Bergman, H. L. *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers. Boca Raton, 1:155-209.
- Junqueira, L. C. U. & Junqueira, L. M. M. S. 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos.
- Laurente, P. & Perry, S.F. 1991. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiological Zoology*. 64: 4-25.
- Lopes, F. F. 2006. Monitoramento ambiental da bacia hidrográfica do lago Guaíba-RS, Brasil, através da utilização de diferentes metodologias aplicadas a taxocenoses de peixes. Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 234p.
- Martinez, C. B., Azevedo, F. & Winkaler, E. U. 2004. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. Pp. 81-95. In: *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*. Ed. José Eurico P. Cyrino e Elizabeth C. Urbinati. Jaboticabal.
- Miron, D. S., Moraes, B., Becker, A. G., Crestani, R. S., Loro, V. L., Baldisserotto, B. 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*. 277: 192-196.
- Miron, D. S., Becker, A. G., Loro, V. L., Baldisserotto, B. 2011. Waterborne ammonia and silver catfish, *Rhamdia quelen*: survival and growth. *Ciência Rural*. 41(2): 349-353.

- Moron, S. E., Andrade, C.A. & Fernandes, M.N. 2009. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerthrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotropical Ichthyology*. 7(3): 491-498.
- Perry, S. F. & Gilmour, K. M. 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respiratory Physiology Neurobiology*. 154: 199-215.
- Piper, R. G., McElwain, I. B., Orme, L. E., McCraren, J. P., Fowler, L. G., Leonard, J. R. 1982. Fish hatchery management. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service, Washington, DC.
- Porto-Foresti, F., Catilho-Almeida, R. B., Senhorini, J. A., Foresti, F. 2010. Biologia e criação do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) In: Baldissotto, B. e Gomes, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Brasil: ed. UFSM. 4: 101–115.
- Randall, D. J. & Tsui, T. K. N. 2006. Tribute to R. G. Boutilier: Acid-base transfer across fish gills. *The Journal of Experimental Biology*. 209: 1179-1184.
- Reis, A. B., Sant’Ana, D. M. G., Azevedo, J. F., Merlini, L. S., Araujo, E. J. A. 2009. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(4): 303-311.
- Robbins, S. & Cotran, R. S. 2005. Patologia-Bases patológicas das doenças. In: Kumar, V., Abbas, A. K, Fausto, N. (Eds) Rio de Janeiro: Elsevier, 1592.
- Rocha, M. B., & Paiva, P. C. 2013. Análises morfométricas de quatro espécies de *Scolecopsis* (Annelida: Spionidae) no litoral do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 53 (5): 67-73.
- Silva, R. D., Rocha, L. O., Fortes, B. D. A., Vieira, D., Fioravanti, M. C. S. 2012. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32 (1): 99-107.
- Verdouw, H. Van Eched, C. J. A., Dekkers, E. M. J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*. 12 (6): 397-402.
- Winkaler, E. U., Silva A. G., Galindo H. C. & Martinez C. B. R. 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, estado do Paraná. *Acta Scientiarum*. 23: 507-514.

CAPITULO III

Histopatologias do fígado de lambaris *Bryconops caudomaculatus* (Gunther, 1864), expostos a concentrações de amônia

Histopathology liver of lambaris *Bryconops caudomaculatus* (GUNTHER, 1864), exposed to
concentration of ammonia

Resumo

Para avaliar possíveis alterações no fígado de lambaris, 150 animais ($16,27\text{g} \pm 1,35$ e $11,41 \pm 0,3\text{cm}$) foram submetidos a diferentes concentrações de amônia não-ionizada NH_3 : 0,003 (controle); 0,15; 0,30; 0,50 e 1,0 (mg L^{-1}) por 4 dias (96h). Posteriormente foram separados aleatoriamente 12 animais de cada tratamento para necropsia e coleta de amostras de fígado. Em seguida foi feita a fixação em Bouin, e os processos de desidratação e diafranização das amostras para inclusão em parafina. A confecção das lâminas foi feita com cortes seriados de 3mm, e a coloração usada para visualização das alterações nas estruturas e na morfologia do fígado foi à Hematoxilina e Eosina (HE), observados em microscópio de luz. Os resultados foram submetidos à análise descritiva (teste de Kruskal-Wallis), onde foram examinados a ocorrência e grau das alterações, assim como os efeitos no funcionamento do fígado. A exposição de lambaris às concentrações de NH_3 acima de $0,30 \text{ mg L}^{-1}$ promoveram alterações histopatológicas, como congestão nos capilares, processos inflamatórios e pigmentação endógena. Nos animais expostos as maiores concentrações de NH_3 (0,50 e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$) apresentaram necrose nos hepatócitos. O aumento dessas alterações prejudicaram as funções vitais, a metabolização, a desintoxicação do organismo e a hematopoiese.

Palavras-chave: alterações, histologia, morfologia, teleósteos, toxicidade.

Abstract

To assess possible changes in the liver of minnows, 150 animals (16.27 ± 1.35 g and 11.41 ± 0.3 cm) were subjected to different concentrations of un-ionized ammonia NH_3 : 0.003 (control); 0.15; 0.30; 0.50 and 1.0 (mg L^{-1}) for 4 days (96h). Subsequently 12 animals were randomly assigned to each treatment for necropsy and collection of liver samples. After fixation in Bouin was taken, and the samples diafranização dehydration and embedded in paraffin process. The preparation of slides was performed with serial sections of 3mm, and the color used to show the changes in the structure and morphology of the liver was hematoxylin and eosin (HE), observed under light microscope. The results were submitted to descriptive analysis (Kruskal-Wallis), where they were examined the occurrence and extent of the changes, as well as the effects on liver function. Exposure of tetra to concentrations NH_3 above 0.30 mg L^{-1} promoted histopathological changes such as congestion in the capillaries, inflammatory processes and endogenous pigmentation. In animals exposed to the highest concentrations of NH_3 (0.50 and 1.00 mg L^{-1}) showed necrosis of hepatocytes. The increase in these changes undermined the vital functions, metabolism, detoxification of the body and hematopoiesis.

Keywords: change, histology, morphology, teleost, toxicity.

Introdução

Na piscicultura intensiva, os peixes normalmente recebem alimento com altos níveis de proteína. Parte desta proteína é assimilada e utilizada na deposição da proteína corporal e o restante é eliminado como nitrogênio inorgânico na forma de amônia. A amônia pode chegar a níveis elevados na água, sendo um fator limitante para o crescimento e a sobrevivência dos organismos aquáticos (PERSON-LE RUYET et al., 1995).

A amônia é um estressor químico para os peixes, inibindo e comprometendo a produção, e a eficácia no desempenho e na sua sobrevivência. O desequilíbrio entre os parâmetros limnológicos e o manejo inadequado do ambiente cultivado, são alguns precursores para os principais problemas relacionados à toxicidade da amônia (PORTO-FORESTI et al., 2010).

Em concentrações excessivas, a amônia na forma não-ionizada (NH_3) pode prejudicar a transformação da energia alimentar em ATP, reduzindo o crescimento dos peixes e provocando a desaminação dos aminoácidos, o que, por sua vez, impossibilita a formação de proteínas, essencial ao crescimento (ARANA, 2010). Segundo WOOD (2001) concentrações sub-letais de amônia podem causar modificações fisiológicas e histológicas nos rins, fígado, baço, tecidos tireóideos e sangue inibindo o crescimento dos peixes.

As alterações histológicas em peixes são utilizadas como biomarcadores dos estressores ambientais e sinalizam os efeitos e respostas resultantes da exposição a agentes tóxicos. Em animais expostos a poluentes essa categoria de biomarcadores tem a vantagem de permitir o exame de órgãos-alvo e células específicas (ALBINATI et al., 2009).

Dentre os órgãos de maior importância do corpo, o fígado realiza funções essenciais como síntese de proteínas, função imune e metabolismo da bilirrubina, dos ácidos biliares, dos carboidratos, lipídios, e dos xenobióticos. Alterações na atividade do fígado estão entre os possíveis efeitos negativos gerados no organismo animal pela amônia, pois o fígado é o principal sítio de metabolismo da amônia (McGAVIN, 2009).

O fígado dos teleósteos, em geral é constituído de parênquima hepático, apresentando lobação reconhecida, com dois ou até três lobos bem distintos e subdivisões hexagonais do parênquima (lóbulo hepáticos) com pouca ou nenhuma subdivisão (VINCENTINI et al.,

2005). As tríades portais, constituídas pela ramificação da veia porta, a artéria hepática e ducto biliar, são indistintas, se não ausentes (BOMBONATO et al., 2007).

Principal órgão do metabolismo de substâncias tóxicas, o fígado entra em contato direto com poluentes absorvidos do ambiente, sendo os hepatócitos considerados como as principais células alvo dos agentes tóxicos. Estes poluentes chegam ao fígado pela corrente sanguínea e exercem seus efeitos nos hepatócitos por maior tempo devido à lentidão do fluxo sanguíneo. Em peixes, o fluxo biliar é mais lento que o de mamíferos, tornando mais lenta a depuração de produtos tóxicos nestes grupos (GINGERICH, 1982).

O *Bryconops caudomaculatus*, popularmente conhecido como lambari ou tetra, é uma espécie neotropical da família Characidae que está amplamente distribuída nos grandes rios formadores das bacias hidrográficas de todo o ambiente tropical. É uma espécie de pequeno porte, que ocorre em águas rápidas com fundos rochosos. Apresenta hábito alimentar onívoro, mas se alimenta de pequenos peixes (grande flexibilidade alimentar) além de servir de alimento para peixes carnívoros (MARTINEZ et al., 2004; PORTO-FORESTI et al., 2010; COSTA-PEREIRA & SEVERO-NETO, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar e identificar possíveis alterações histológicas no fígado de lambaris (*Bryconops caudomaculatus*) expostos a diferentes concentrações de amônia não-ionizada (NH₃).

Material e Métodos

Juvenis de lambari foram coletados na região de Araguaína/TO (Lat. 7°11'31 Sul/ Long. 48°12'28 Oeste) e em seguida transportados para o Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins (UFT), onde foram

aclimatados durante 30 dias em caixas de 250L com aeração constante e alimentados duas vezes ao dia, com ração comercial (40% de proteína bruta).

Após a aclimação, 150 lambaris ($16,27\text{g} \pm 1,35$ e $11,41 \pm 0,3\text{cm}$), foram distribuídos aleatoriamente em 15 caixas de polietileno (250L), numa densidade de 10 juvenis por caixa, onde permaneceram por quatro dias (96 horas) para o experimento. Os animais foram submetidos a cinco tratamentos, com concentrações de NH_3 (mgL^{-1}): controle $0,003 \pm 0,4$; $0,15 \pm 0,5$; $0,30 \pm 0,3$; $0,50 \pm 0,5$; $1,00 \pm 0,4$. Para cada concentração de NH_3 foram feitos testes em triplicata. A concentração de amônia não ionizada foi mantida através da adição de solução de NH_4CL concentrado, segundo MIRON et al. (2011). Foi respeitado o limite de NH_3 para espécie da mesma família, descrito por PORTO-FORESTI et al., (2010), que relataram mortalidade em concentrações de amônia acima de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$.

Diariamente foi feita a limpeza das caixas por sifonagem para retirada de resíduos (fezes) e mantida aeração constante durante o período experimental. A água retirada foi substituída por outra nas mesmas condições do início do experimento numa renovação diária de até 40% da água das caixas. Durante o experimento não foi fornecido alimento aos indivíduos e a cada 12 horas as caixas foram revisadas para observar alterações comportamentais como frequência respiratória, natação, canibalismo e para contabilizar a sobrevivência.

As análises do oxigênio dissolvido e da temperatura da água foram efetuadas diariamente com um oxímetro digital (ITT 71440) e o pH foi aferido pelo método de azul de bromofenol. As concentrações de amônia dos respectivos tratamentos foram analisadas segundo VERDOUW et al. (1978), e a NH_3 foi calculada segundo PIPER et al. (1982). A dureza da água por titulometria segundo GREENBERG et al. (2005) e o nitrito (BOYD &

TUCKER, 1992) foram determinados no início e ao final do período experimental apenas para controle.

Após 96 horas de exposição, foram coletados aleatoriamente 12 animais de cada tratamento (04 por repetição) e colocados em recipiente contendo água e gelo (5 minutos) a fim de anestesiá-los, para posterior necropsia e coleta de material para as análises. As amostras de fígado foram fixadas em Bouin, em seguida passaram pelo processo de desidratação e diafranização para a inclusão em parafina. Para a confecção das lâminas, foram feitos cortes seriados de 3 mm e a coloração usada para a visualização de possíveis alterações nas estruturas morfológicas do fígado foi à Hematoxilina e Eosina (HE) e posteriormente analisados em microscópio de luz (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Os resultados das alterações no fígado foram submetidos à análise descritiva, onde foram examinados a ocorrência e grau das lesões, assim como os efeitos das concentrações de NH_3 no funcionamento do mesmo. As alterações foram classificadas de acordo a incidência: 0 sem alterações visíveis; + alterações leves, com incidência em até 30 hepatócitos lesionadas; ++ incidência entre 30 a 60 campos; +++ incidência com mais de 60 campos com alterações (GAD & ROUSSEAU, 2002). Para as análises estatísticas foram atribuído números para os escores: 0 para nenhuma lesão, 1 para +, 2 para ++ e 3 para +++.

Para a determinação da área coberta por glicogênio, foram contados os grânulos de glicogênio contidos em 10 campos por lâmina. As mensurações feitas para a morfometria foram realizadas em fotografias obtidas por câmera digital LEYCA DM 500, com objetiva superplanocromática com um aumento de 400 vezes.

Foi feita ANOVA (Teste de Dunnett) para os dados paramétricos, e para os não paramétricos (alterações histológicas), os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis através do programa estatístico software GraphPad Instat v 3.00 para Windows 95®

(GRAPHPAD INSTAT, 1998). O nível mínimo de significância considerado foi de 95% (P<0,05).

Resultados e Discussão

A qualidade da água não diferiu entre os tratamentos durante o período experimental (Tabela 1). Os valores obtidos de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e dureza mantiveram-se dentro da faixa recomendável para o cultivo de peixes da mesma família (GARUTTI, 2003; PORTO-FORESTI et al., 2010).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água durante o período experimental (96 horas).

Parâmetros	0,003 mg L ⁻¹	0,15 mg L ⁻¹	0,30 mg L ⁻¹	0,50 mg L ⁻¹	1,00 mg L ⁻¹
¹ pH	6,3 ± 0,2	6,4 ± 0,1	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,4	6,4 ± 0,3
¹ Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	8,5 ± 0,1	8,7 ± 0,3	8,5 ± 0,6	8,6 ± 0,4	8,5 ± 0,4
¹ Temperatura (°C)	26,2 ± 0,3	26,7 ± 0,6	25,6 ± 0,4	25,6 ± 0,2	26,7 ± 0,1
¹ NH ₃ (mg L ⁻¹)	0,003 ± 0,4	0,15 ± 0,5	0,32 ± 0,3	0,53 ± 0,5	1,05 ± 0,4
*Dureza ((mg L ⁻¹ CaCO ₃)	52,5	54,5	55,5	60,5	60,5
*Nitrito (mg L ⁻¹)	0,075	0,100	0,170	0,250	0,300

¹Valores de médias e erros padrão p<0,05 * Médias.

Durante todo o período experimental, houve mortalidade de apenas 1% dos animais no tratamento com 0,50 mg L⁻¹ NH₃, podendo ser atribuída a variação decorrente aos animais, já que nos outros tratamentos não foi observado mortalidade. Registros de espécies de peixes que toleram altos níveis de amônia na água têm sido apresentados *Opsanus beta*, *Opsanus tau* e *Porichthys notatus*, todos da família Batrachoididae (WANG & WALSH, 2000). Essa tolerância pode estar associada a adaptações ou estratégias desenvolvidas pelos peixes ao

longo de sua evolução, como o fato de minimizarem a ação da amônia produzindo compostos derivados como a uréia em *Clarias batrachus* (SAHA et al., 2002), ou glutamina, em *Oncorhynchus mykiss* (WICKS & RANDALL, 2002). Em *Oreochromis niloticus* foi observado (BENLÍ et al., 2008) grande resistência aos efeitos tóxicos da amônia, ocorrendo mortalidade apenas em níveis acima de 4,98 mg L⁻¹.

As células hepáticas possuem diversas funções vitais como a metabolização de proteínas, lipídeos e carboidratos, atuam na desintoxicação do organismo e na hematopoiese, durante a fase larval, além de estarem envolvidos na produção de anticorpos (SIMONATO et al., 2007).

A síntese e a deposição de glicogênio no fígado são influenciadas pelo consumo e gasto de energia. Medidas morfométricas no núcleo dos hepatócitos são utilizadas para mostrar que o volume nuclear apresenta redução significativa decorrente do gasto energético (CARRIQUIRIBORDE et al., 2007)

A superfície ocupada por grânulos de glicogênio hepático dos peixes submetidos ao tratamento com 0,5 mg L⁻¹, foi menor do que aquela encontrada nos hepatócitos dos peixes do tratamento controle (0,003 mg L⁻¹ NH₃). No tratamento com 1,0 mg L⁻¹ NH₃, houve grande incidência de necrose, impossibilitando a visualização desta alteração.

Assim, a maior quantidade de energia gasta pelos peixes submetidos às maiores concentrações de amônia não-ionizada (0,5 e 1,0 mg L⁻¹), pode ter reduzido a atividade nuclear dos hepatócitos, o que resultou em menor quantidade de glicogênio estocado e menor diâmetro dessas células (Figuras 1), mecanismo importante para manter a osmorregulação (EVANS et al., 2005).

Foi observada neste estudo a diminuição no acúmulo de glicogênio nos indivíduos expostos a níveis mais elevados de amônia em relação ao tratamento controle (Tabela 2),

revelando que uma parte destes nutrientes foi recrutada para o controle da intoxicação e possivelmente com a deteriorização dos hepatócitos, foi diminuída a capacidade de armazenamento de nutrientes nos mesmos.

Tabela 2. Frequência das histopatologias no fígado de lambari *B. caudomaculatus* expostos a concentrações de amônia não ionizada (NH₃).

	0,003 mg L ⁻¹	0,15 mg L ⁻¹	0,30 mg L ⁻¹	0,50 mg L ⁻¹	1,00 mg L ⁻¹
Coolestase	+	+	++	++	++
Desorganização Hepática	+	+	+	++	++
Degeneração Vacuolar	+	++	++	++	++
Acúmulo de glicogênio	+++	++	++	++	++
Dilatação dos capilares	+	+	++	+++	+++
Congestão	+	+	++	+++	+++
Hiperplasia das células de Kupffer	+	++	++	++	++
Dilatação dos sinusóides	+	++	++	++	++
Infiltrado inflamatório	+	++	++	++	+++
Necrose	0	+	+	++	++

(0) ausente; (+) leve; (++) moderada; (+++) acentuada.

*Estatística Descritiva, Teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

A avaliação histopatológica do fígado dos lambaris expostos ao NH₃ (Figura 1) evidenciou congestão, necrose de hepatócitos, infiltrado inflamatório mononuclear no hepatopâncrea, e hepatócitos contendo pigmentos de bilirrubina. Segundo ROBBINS & COTRAN (2005), a extensão e a gravidade da lesão é proporcional ao tipo, a duração, a severidade da agressão e ao estado fisiológico da célula envolvida.

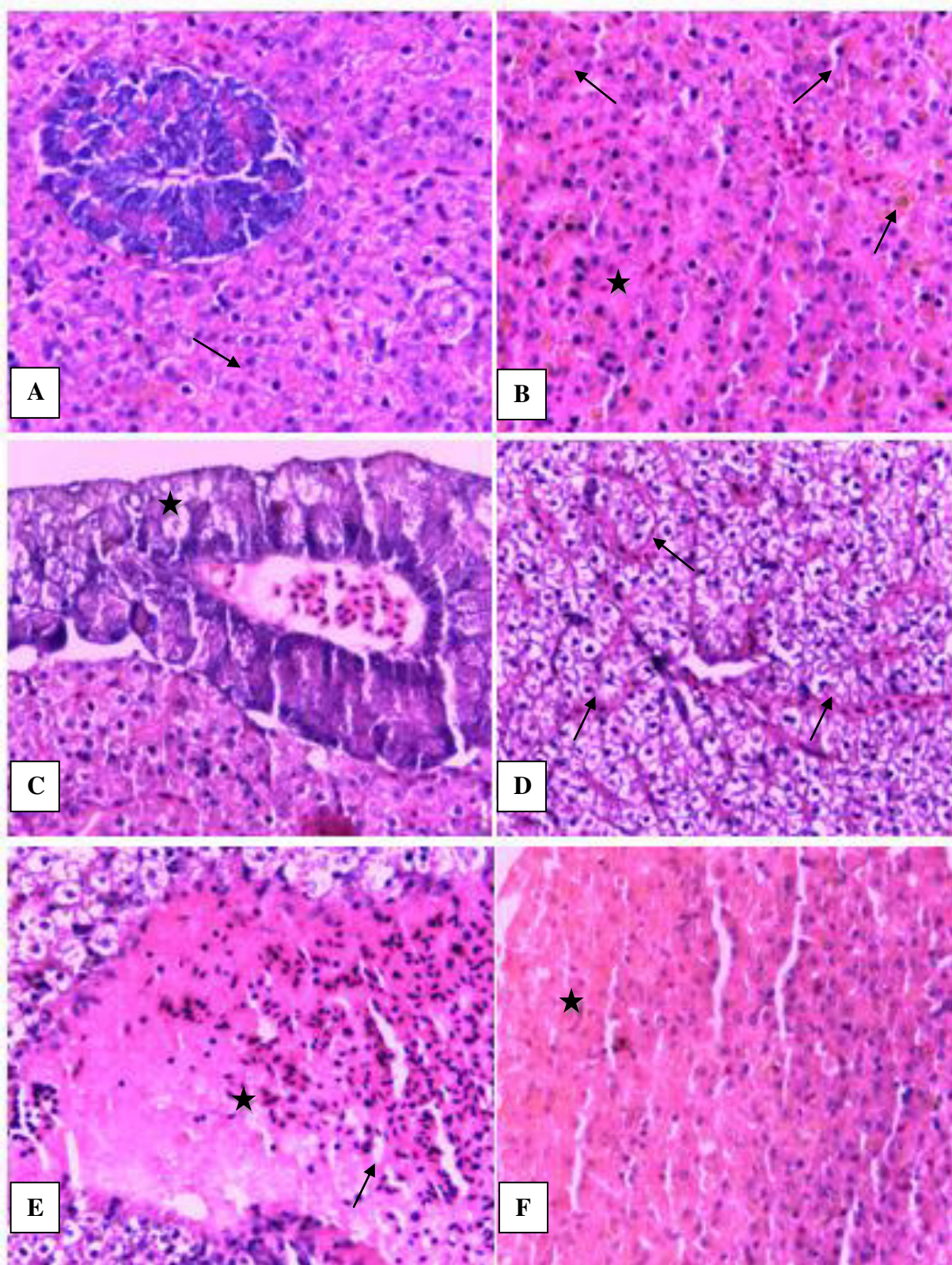


Figura 1: Fotomicrografia dos fígados de *Bryconops caudomaculatus* (A) Tratamento 1: (controle) sem alterações expressivas, degeneração vacuolar com aumento de glicogênio; (B) Tratamento 2: Área afetada com pigmentação endógena (seta), infiltrado inflamatório (estrela); (C) Tratamento 3: Dilatação da parede epitelial do capilar; (D) Tratamento 3: Enraizamento com proliferação das células de Kupffer, dilatação dos sinusóides; (E) Tratamento 4: Congestão do capilar (estrela), presença de linfócitos (seta); (F) Tratamento 5: Necrose, desorganização hepatológica. Coradas com HE. 400x

Esses resultados evidenciam que a exposição de peixes a ambientes com elevada concentrações de NH_3 pode ocasionar danos no fígado, como a vacuolização dos hepatócitos, diminuição das reservas de glicogênio e outras alterações, comprometendo as funções vitais dos mesmos. A degeneração encontrada no fígado dos animais expostos aos níveis mais altos de amônia não ionizada (0,30, 0,50 e 1,00 mg L^{-1}), é um estágio de degeneração, o qual é caracterizado por vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear, estagnação biliar e núcleos picnóticos, devido principalmente a degradação citoplasmática e a vacuolização (MADUENHO & MARTINEZ, 2008).

O fígado como glândula digestiva tem a função de secretar bile, a qual é produzida pelas células hepáticas e transportada para canalículos intracelulares e posteriormente levada para canalículos extracelulares. Observou-se uma diminuição na concentração de bile no tecido hepático (Figura 1-B), em função do aumento das concentrações de amônia não ionizada, o que possivelmente resultou em diminuição da secreção de bile pelos hepatócitos, gerando pigmentação endógena (JIRAUNGKOOSKUL et. al., 2002; THOOLEN et al., 2010).

A permanência de bile na forma de grânulos castanho-amarelado no citoplasma dos hepatócitos sugere uma possível estase biliar. A bilirrubina é um subproduto normal, mas em certas ocasiões pode ocorrer em excesso. Pode ter ação antioxidante e por ser parte integrante da bile pode servir como meio de excreção de xenobióticos entre outras substâncias (ZACHARY & McGAVIN, 2013).

Essa alteração, denominada colestase ou estagnação biliar, é uma alteração metabólica, onde é a manifestação de uma condição patofisiológica atribuída à falha do metabolismo ou da excreção de pigmentos biliares (FANTA et al. 2003). SANTOS et al. (2004) em estudo com tilápias criadas em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo observou um acúmulo de bile ou estase biliar, indicando possível dano ao metabolismo hepático.

Resultados semelhantes foram encontrados por CAMARGO & MARTINEZ (2007), onde as principais alterações foram o aumento do volume nuclear e celular, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, vacuolização nuclear e estagnação biliar, com colestase. Estes danos provavelmente são causados devido a um acúmulo da amônia no fígado, que causaram posteriormente a degeneração e necrose dos hepatócitos, tumefação da parede do endotélio vascular, limitando as funções vitais do fígado, prejudicando o organismo em geral.

Observou-se também que houve uma alta concentração de linfócitos em torno dos vasos (FIGURA 1-E) no tratamento 4 ($0,50 \text{ mg L}^{-1}$). Houve também uma vacuolização mais rápida das células mais próximas aos grandes vasos, onde o metabolismo das mesmas ficou comprometido. Isto se deve, provavelmente, a uma alta atividade das células mais próximas aos vasos, que acabam por entrar em contato mais rápido com as toxinas (LINS et al., 2010).

A morte de uma célula ou parte de um tecido em um organismo vivo é caracterizado como necrose. A necrose hepática foi observada de forma moderada nos peixes expostos as maiores concentrações de NH_3 ($0,5$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$). A ocorrência de necrose hepática também foi observada por SILVA (2004) em peixes com sinais de intoxicação. A congestão sugere que o fluxo sanguíneo que drena uma área é obstruído e, conseqüentemente, o sangue se acumula na circulação venosa. Pode ser causada por obstrução física de pequenos ou grandes vasos ou pela falha do fluxo normal (JONES et al., 2000).

O processo de congestão foi observado moderadamente nos peixes expostos a $0,30 \text{ mg L}^{-1}$ e com maior frequência no tratamento com as concentrações de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Esses resultados corroboram com CAMPOS et al. (2008) que observaram o mesmo processo em peixes silvestres. Possivelmente o processo de necrose focal, impossibilitou a visualização desta alteração no tratamento $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, já que é um estágio histopatológico crítico.

Conclusão

Conclui-se que a exposição a diferentes concentrações de amônia não-ionizada, promoveram alterações histológicas no fígado de lambaris (*Bryconops caudomaculatus*), relacionadas aos processos de intoxicação, e que concentrações acima de 0,30 mg L⁻¹ provocaram um aumento no grau e na intensidade destas lesões.

Agradecimento

A Universidade Federal do Maranhão/UFMA, a Universidade Federal do Tocantins/UFT e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão/FAPEMA.

Comitê de Ética e Biossegurança

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Tocantins/TO (Protocolo Número: 23101.000282/2014.16).

Referências

ALBINATI, A.C.L., et al. **Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, n.3, p.621-627, 2009. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n3/15.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2014. Doi: 10.1590/S0102-09352009000300015.

ARANA, L.V. **Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas**. 3ed. rev. Florianópolis: ed. UFSC, 2010. 238p.

BENLI, A.C.K. et al. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. **Chemosphere**, v.72, p.339-344, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.037>>. Acesso em: 21 dez. 2013. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.04.037.

BOMBONATO, M.T.S. et al. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.29, n.1, p.81-85, 2007. Disponível em: <[http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article /view/157](http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/157)>. Acesso em: 15 de dez. de 2013. doi:10.4025/actascibiolsci.v29i1.157.

BOYD, C.E. & TUCKER, C.S. **Water quality and pond soil analyses for aquaculture**. Auburn University, Auburn. 1992. 183p.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v.5, n.3, 327-336p. 2007. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/ni/v5n3/a13v5n3.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

CAMPOS, C.M. et al. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.4, 200-205p, 2008. Disponível em:<http://www.cbpv.com.br/rbpv/documentos/1742008/c174200_205.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2008.

CARRIQUIRIBORDE, P. et al. Nucleolar variation in response to nutritional condition in juvenile pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes). **Journal of Fish Biology**. v.70,

947-958p, 2007. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/230050044_Nucleolar_variation_in_response_to_nutritional_condition_in_juvenile_pejerrey_Odontesthes_bonariensis_\(Valenciennes\)](http://www.researchgate.net/publication/230050044_Nucleolar_variation_in_response_to_nutritional_condition_in_juvenile_pejerrey_Odontesthes_bonariensis_(Valenciennes))>. Acesso em: 13 dez. 2013. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01357.x.

COSTA-PEREIRA, RAUL; SEVERO-NETO, FRANCISCO. Dining out: *Bryconops caudomaculatus* jumps out of water to catch flies. **Rev. Chil. Hist. Nat.**, Santiago, v. 85, n. 2, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2012000200012&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 14 abr. 2014. doi.org/10.4067/S0716-78X2012000200012.

EVANS, J.J. et al. No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed heat-treated and non-heat-treated raw soybean meal. **Aquaculture Nutrition**, v.11, 123-129p, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2095.2004.00329.x/abstract>>. Acesso em: 15 fev. 2014. doi: 10.1111/j.1365-2095.2004.00329.x.

FANTA, E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, n.2, 119-130p, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00044-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00044-1)>. Acesso em: 10 jan. 2014. doi:10.1016/S0147-6513(02)00044-1.

GAD, S. C. & ROUSSEAU, C. G. Use and misuse of statistics in the design and interpretation of studies. In: HASCHEK W.M. et al. **Handbook of Toxicologic Pathology**, Academic Press, San Diego, 2ª ed., v.1, n.15, 327-418p, 2002.

GARUTTI, V. **Piscicultura Ecológica**. 1ª ed. UNESP. 69P. 2003.

GINGERICH, W.H. **Hepatic toxicology of fishes**. In: WEBER, L. F. **Aquatic toxicology**, New York: Plenum Press. 1982. 55-105p.

GRAPHPAD INSTAT. 1998. **Instat guide choosing and interpreting statistical tests, version 3.00**. San Diego, 1998. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>> Acesso em: 10 agos. 2013.

GREENBERG, G. et al. Limits of RO recovery imposed by calcium phosphate precipitation. **Desalination**, v.183, 273-288p, 2005. Disponível em: <http://gwri-ic.technion.ac.il/pdf/gwri_abstracts/2051/2.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2013. doi:10.1016/j.desal.2005.04.026.

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al.; Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), **Sciencia Asia**, v.28, 121-127p. 2002. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=21FAFBDD61DD23F58AFDE20F00EE50B0?doi=10.1.1.3.4073&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2013.

JONES, T.C. et al. **Patologia Veterinária**, 6ª ed., ed. Manole LTDA. 1415p. 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos. 1983.

LINS et al., Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica, Ciência Agrária e Ambiental**. v.8, n.4, 469-484p, 2010. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/academica?ddl=4518&dd99=view>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

MARTINEZ, C. B. et al. **Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais**. In: CYRINO, J. E. P. & URBINATI, E. C. **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**. ed.. Jaboticabal. 81-95p. 2004.

MADUENHO, L.P. & MARTINEZ, C.B.R., Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, Toxicology

& Pharmacology, v.148, n.3, 265-272p, 2008. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/51402875_Acute_effects_ofdiflubenzuron_on_the_freshwater_fish_Prochilodus_lineatus> Acesso em: 20 dez. 2013. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.010.

MCGAVIN, M. D., **Bases da Patologia em Veterinária**, Ed. Elsevier, 4ª ed. 1496p. 2009.

MIRON, D.S. et al. Waterborne ammonia and silver catfish, *Rhamdia quelen*: survival and growth. **Ciência Rural**, v.41, n.2, 349-353p, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782011000200028&script=sci_arttext> Acesso em: 05 jul. 2013. doi:10.1590/S0103-84782011000200028.

PERSON-LE RUYET, J. et al. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. **Aquaculture**. v.136, p.181–194. 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848695010262>>. Acesso em: 10 set. 2013. doi:10.1016/0044-8486(95)01026-2.

PIPER, R. G. et al. **Fish hatchery management**. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. 1982.

PORTO-FORESTI, F. et al. **Biologia e criação do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*)** in: BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Brasil: ed. UFSM. Cap. 4, 101–115p, 2010.

ROBBINS, S. & COTRAN, R.S. **Patologia-Bases patológicas das doenças**. In: KUMAR, V., ABBAS, A. K, FAUSTO, N. Rio de Janeiro: Elsevier, 1592p, 2005.

SANTOS, A.A. et al.; Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criadas em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, n.2, 141-145p, 2004. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000120&pid=S0100-204X201300080002900024&lng=es> Acesso em: 10 dez. 2013.

SAHA, N. et al. Role of amino acid metabolism in air-breathing catfish, *Clarias batrachus* in response to exposure to a high concentration of exogenous ammonia. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v.133, n.2, 235-250p, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381386>> Acesso em: 10 dez. 2013.

SILVA, A.G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquática**. 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

SIMONATO, J. D., GUEDES, C. L. B., MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2008. v. 69, 112-120p. Disponível em: <<http://www.uel.br/laboratorios/lefa/SIMONATO%20et%20al%202008.pdf>> Acesso em: 13 de dez. de 2013. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.01.012.

THOOLEN, B. et al.; Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. **Toxicologic Pathology**, 2010. v.38, 5-81p. Disponível em: <http://tpx.sagepub.com/content/38/7_suppl/5S.full.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2013. doi:10.1177/0192623310386499.

VERDOUW, H. et al. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. **Water Research**. v.12, n.6, 399-402p, 1978. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043135478901070>>. Acesso em: 10 dez. 2013. doi:10.1016/0043-1354(78)90107-0.

- VICENTINI, C.A. et al. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **Int Journal of Morphology**, v.23, n.3, 211-216p, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v23n3/art03.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014. doi:10.4067/S0717-95022005000300003.
- ZACHARY, J. F. & MCGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. ed. Elsevier, 5ª ed. 1344p. 2013.
- WANG, Y.; WALSH, P.J. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). **Aquatic Toxicology**, v.50, n.3, 205- 219p, 2000. Disponível em: <<http://65.54.113.26/Publication/40716718>> Acesso em: 15 jan. 2014. doi: 10.1016/S0166-445X(99)00101-0.
- WICKS, B.J.; RANDALL, D.J. The effect of feeding and fasting on ammonia toxicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic toxicology**, v.59, n.1-2, 71-82p, 2002. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/11286226_The_effect_of_feeding_and_fasting_on_ammonia_toxicity_in_juvenile_rainbow_trout_Oncorhynchus_mykiss> Acesso em: 10 jan. 2013. doi:10.1016/S0166-445X(01)00237-5.
- WOOD, C.M. **Toxic responses of the gill**. In: SCHLENK, D.; BENSON, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts: Organs**. Taylor; Francis, London, v.1, cap.1, 1-89p. 2001.

ANEXO 1: NORMAS DA REVISTA REFERENTES AO CAPITULO 2 NEOTROPICAL ICHTHYOLOGY

- **Escopo e política editorial**

O manuscrito deve conter os resultados de pesquisas originais em peixes neotropicais de água doce e marinhos nas áreas de Biologia, Ecologia, Etologia, Fisiologia, Genética e Biologia Molecular e Sistemática.

Notas científicas não são aceitas. O Editor e os editores de área irão realizar uma análise prévia do manuscrito submetido para analisar se o seu conteúdo é apropriado para a revista **Neotropical Ichthyology**.

A revista está aberta para submissões a todos os pesquisadores da ictiofauna Neotropical. O pagamento dos custos de publicação pode ser requerido se nenhum dos autores for membro da Sociedade Brasileira de Ictiologia.

- **Submissão de manuscritos**

Manuscritos devem ser submetidos como arquivos digitais no sítio <http://mc04.manuscriptcentral.com/ni-scielo>.

Na submissão do manuscrito, os autores devem incluir uma carta com uma declaração de que se constitui em pesquisa original não submetida a outro periódico.

Nos manuscritos com múltiplos autores, o autor responsável pela submissão deve declarar na carta de submissão que todos os co-autores estão cientes e de AC

ordo com a submissão do manuscrito. Todos os co-autores e respectivos e-mails devem ser registrados nos formulários indicados durante a submissão do manuscrito.

Durante a submissão, indicar a área da revista (Bioquímica e Fisiologia, Biologia, Ecologia, Etologia, Genética e Biologia Molecular, Sistemática) a que o manuscrito se refere.

Durante a submissão, indique três possíveis referees (nome, instituição, país e email) para a análise do manuscrito.

Manuscritos submetidos fora do formato requerido nas instruções aos autores serão devolvidos. Manuscritos submetidos com uso inapropriado da língua inglesa serão devolvidos sem revisão. O uso adequado da língua inglesa é um requisito para a revisão e publicação.

- **Forma e preparação de manuscritos**

Texto deve ser em Word for Windows ou arquivos rtf;

Figuras e tabelas devem ser carregadas separadamente como arquivos individuais;

Não duplique informações no texto, figuras e tabelas. Apresente apenas figuras e tabelas que são estritamente necessárias.

- **Formato:** Texto deve ser apresentado em inglês.

- **O manuscrito deve conter os seguintes itens, nesta ordem:**

Título: Título em minúsculas da seguinte forma: “*Isbrueckerichthys epakmos*, a new species of loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes)”. Táxons subordinados devem ser separados por dois-pontos, como segue: “(Siluriformes: Loricariidae)”.

Autor (es) nome (s): Só as iniciais devem ser em letras maiúsculas. Nunca abrevie o primeiro nome.

Endereços: Não apresente os endereços em nota de rodapé. Use números arábicos sobrescritos¹ para identificação no caso de múltiplos autores e endereços. Listar endereços completos e email de todos os autores.

Abstract: Em inglês.

Resumo: Em Português ou espanhol. Deve ter o mesmo conteúdo do *Abstract* em inglês.

Palavras-chave: Cinco palavras-chave em inglês, não repetir palavras ou expressões do título.

Introdução

Material e Métodos

Resultados

Discussão

Agradecimentos

Literatura citada

Tabela (s)

Legenda(s) da(s) Figura(s):

Em trabalhos taxonômicos Verifique também: *Neotropical Ichthyology taxonomic contribution style sheet*.

- **Texto**

Páginas de texto não podem incluir cabeçalhos, rodapés, ou notas de rodapé (exceto o número de página) ou qualquer formato de parágrafo. Texto deve ser alinhado à esquerda.

Usar Times New Roman fonte tamanho 12. Não hifenizar o texto.

Usar a fonte "symbol" para representar os caracteres a seguir:

χ μ θ ω ε ρ τ ψ υ ι ο π α σ δ φ γ η φ κ λ ε π β ν ≅ Θ Ω Σ Δ Φ

Espécies, gêneros e termos em Latim (*et al.*, *in vitro*, *in vivo*, *vs.*) devem ser em itálico.

Termos em Latim apresentados entre os nomes genéricos e específicos - cf., aff. (por exemplo, *Hoplias* cf. *malabaricus*) não devem ser em itálico.

Não abreviar o nome do gênero no início de uma frase. Não sublinhar palavras.

Os títulos a seguir devem ser apresentados em negrito: **Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Literature Cited.**

Listar abreviaturas utilizadas no texto em Material e métodos, exceto para aqueles de uso comum (por exemplo, min, km, mm, kg, m, s, h, ml, L, g).

As medidas devem usar o sistema métrico.

Manuscritos devem conter as siglas institucionais e os números de catálogo de espécimes-testemunho.

Descritores geográficos (rio, igarapé, arroio, córrego) devem ser em letras minúsculas, exceto quando se refere a um nome de localidade (*e.g.* municipality of Arroio dos Ratos, State of Rio Grande do Sul, etc). O agradecimento deve ser conciso.

- **Nomenclatura**

Nomes científicos devem ser citados de acordo com o ICZN (1999).

A autoria de nomes científicos é necessária apenas em trabalhos taxonômicos e na primeira referência de uma espécie ou gênero. Não inclua autoria no resumo e abstract.

Verifique a ortografia, nomes válidos e autoria de espécies no *Catalog of fishes* em <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

- **Tabelas**

Tabelas devem ser numeradas sequencialmente de acordo com a sua ordem de citação no texto, usando os seguintes formatos: Table 1, Tables 1-2, Tables 1, 4.

A palavra **Table** e o respectivo número devem ser grifados em negrito nas legendas das Tabelas.

Tabelas devem ser construídas usando linhas e colunas; não use tabulações e espaços. Não podem conter linhas verticais ou notas de rodapé. Arquivos digitais de tabelas devem ser formatados em células. Arquivos digitais de tabelas com colunas separadas por tabulação ou espaço não serão aceitas.

Legendas devem ser incluídas no final do manuscrito, no seguinte formato: **Table 1. Monthly variation of the gonadosomatic index in *Diapoma speculiferum*....**

Os locais aproximados onde as tabelas devem ser inseridas devem ser indicados ao longo da margem do texto.

- **Figuras**

Figuras devem ser numeradas sequencialmente de acordo com a sua ordem de citação no texto, usando os seguintes formatos: Fig. 1, Figs. 1-2, Fig. 1a, Figs. 1a-b, Figs. 1a, c.

A palavra **Fig.** e respectivo número devem ser apresentados em negrito nas legendas. Figuras devem ser de alta qualidade e definição.

Texto incluído em gráficos e imagens deve ter tamanho de fonte compatível com reduções à largura da página (175 mm) ou largura da coluna (85 mm). Gráficos serão impressos preferencialmente com a largura de uma coluna (85 mm).

Fotos coloridas serão aceitas somente se necessário e o custo da impressão poderá ser cobrado dos autores. Figuras compostas devem ser preparadas a fim de ajustar-se à largura da página (175 mm) ou largura da coluna (85 mm).

Ilustrações devem incluir uma escala ou uma referência para o tamanho do item ilustrado na legenda da figura. Nunca inclua objetos ou ilustrações na legenda da figura. Substituir por texto (por exemplo, "triângulo negro") ou representar seu significado na própria figura. Uma lista de legendas das figuras deve ser apresentada no final do arquivo do manuscrito.

- **Literatura citada**

Use os seguintes formatos de citação no texto: Eigenmann (1915, 1921) ou (Eigenmann, 1915, 1921; Fowler, 1945, 1948) ou Eigenmann & Norris (1918) ou Eigenmann *et al.* (1910a, 1910b).

Não inclua resumos e relatórios técnicos na literatura citada. Evite referências desnecessárias a teses ou dissertações. Nunca use tabulação ou espaço para formatar referências. A literatura citada deve ser ordenada em ordem alfabética. Referências com dois ou mais autores devem ser listadas na ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor e, em seguida, do sobrenome do segundo autor e assim sucessivamente.

Não abreviar nomes dos periódicos. Não use itálico ou negrito para títulos de livros e revistas. As citações no texto devem corresponder às referências em Literatura Cited.

- **Use os seguintes formatos:**

Livros:

Campos-da-Paz, R. & J. S. Albert. 1998. The gymnotiform "eels" of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriphysi). Pp. 419-446. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs.

Teses/Dissertações:

Langeani, F. 1996. Estudo filogenético e revisão taxonômica da família Hemiodontidae Boulenger, 1904 (sensu Roberts, 1974) (Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 171p.

Artigos:

Lundberg, J. G., F. Mago-Leccia & P. Nass. 1991. *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) from deep river channels of South America and delimitation of the subfamily Pimelodinae. Proceedings of the Biological Society of Washington, 104: 840-869.

Artigos no prelo:

Burns, J. R., A. D. Meisner, S. H. Weitzman & L. R. Malabarba. (in press). Sperm and spermatocyte ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes: Auchenipteridae). Copeia, 2002: 173-179.

Recursos da Internet:

Author. 2002. Title of website, database or other resources, Publisher name and location (if indicated), number of pages (if known). Available from: <http://xxx.xxx.xxx/> (Date of access).

- **INFORMAÇÕES ADICIONAIS:** Contate o editor em neoichth@ufrgs.br

ANEXO 2: NORMAS DA REVISTA REFERENTES AO CAPITULO 3

REVISTA CIÊNCIA RURAL

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.**

Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo: O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992,

Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34,

n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: [http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

14. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

15. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UFT**

O projeto intitulado “Tolerância de lambaris (*Bryconops causomaculatus*) submetidos a diferentes concentrações de amônia”, processo nº 23101.000282/2014-16 sob a responsabilidade de Mayara Ribeiro, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pelo parecerista da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Araguaína, 28 de março de 2014.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita de Alberto Yim Júnior em tinta preta.

Alberto Yim Júnior
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFT