



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA APLICADA**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EM *TILAPIA
RENDALLI* COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL DO
RIO CACHOEIRA, BAHIA**

MILANE ALVES CORREIA

Ilhéus - BA
2013

MILANE ALVES CORREIA

ANÁLISE HISTOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EM *TILAPIA RENDALLI* COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL DO RIO CACHOEIRA, BAHIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Zoologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fábio Flores Lopes

Ilhéus - BA

2013

MILANE ALVES CORREIA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EM *TILAPIA RENDALLI* COMO
INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL DO RIO CACHOEIRA, BAHIA**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fábio Flores Lopes
UESC/DCB (Orientador)

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
UEL

Profa. Dra. Guisla Boehs
UESC/DCB

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por me encher de fôlego de vida todas as manhãs e a todos os que me apoiaram, direta e indiretamente, família, amigos, professores e colegas.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu amor incondicional, pelas suas misericórdias que se renovam a cada manhã e pelo privilégio de chamá-lo de Pai, Aba-pai, meu paizinho.

Aos meus pais Chiquinho e Mira, pelo incentivo, apoio, amor, carinho e dedicação.

A minha irmã Milana, pela paciência, conselhos e companheirismo.

Ao professor, orientadore amigo, Fábio Flores-Lopes, pela orientação, incentivo, dedicação e por acreditar em mim.

A CAPES pela concessão da bolsa, apoiando e incentivando a minha formação como pesquisadora.

A aqueles que poderiam ter sido apenas colegas, mas se tornaram amigos, Caroline, Muriel, Luciano, Yamid e Ana Carla, que com certeza contribuíram para que esta etapa fosse mais gratificante.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório Driele, Maxwel e Mary, por terem tornado o ambiente de trabalho tão harmônico, agradável e divertido.

A minha companheira de trabalho Elaine, pela dedicação, parceria e cumplicidade.

Aos meus companheiros de coleta Francino, João, Acta, Edirlan e Mateus, por cada arrasto realizado, cada peixe coletado e por ter feito que as coletas fossem mais agradáveis.

A Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, pela infra-estrutura e pelo financiamento do projeto.

A José pelo grande auxílio dado no preparo e análise do material no Centro de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A Prof^a. Dr^a. Daniela Mariana Lopes de Silva e ao Laboratório de Biogeoquímica Marinha da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, por ter contribuído para a realização das análises físico-químicas da água.

A Prof^a. Dr^a Cristina Luisa Conceição Oliveira pelo auxílio no preparo do material na análise de ultraestrutura.

Aos funcionários da UESC, Augusta, Tiago e Gerson pelo apoio e auxílio.

“Eu guardei muitas coisas em minhas mãos, e perdi todas. Mas todas que coloquei nas mãos de Deus, essas eu ainda possuo.”

Martin Luther King

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade ambiental do rio Cachoeira por meio da análise físico-química da água, assim como análise histopatológica e ultraestrutural do fígado de *Tilapia rendalli*. Foram realizadas amostragens em seis pontos, abrangendo os municípios de Itapé, Itabuna e Ilhéus. Os peixes foram coletados com rede de arrasto do tipo picaré e puçá. Foi utilizada a técnica histológica de rotina de inclusão e impregnação em parafina. E com análise em microscópio de luz as alterações histopatológicas foram classificadas em leve, moderada e severa e avaliadas semiquantitativamente por meio do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), sendo baseado na severidade das lesões. Para análise de ultraestrutura, os fígados foram fixados em glutaraldeído, incluídos em resina, seccionados, contrastado com uranila 0,5% e analisados em um microscópio eletrônico de transmissão. Amostras de água foram coletadas e foram tomadas as medidas de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, turbidez e condutividade elétrica. Os testes de kruskal-wallis e Mann-Whitney foram usados para comparar os resultados. Tanto na análise histológica como na de ultraestrutura foram observadas alterações, sendo as principais: retilinização dos vasos sanguíneos, vacuolização e/ou degeneração do citoplasma, núcleo picnótico, hipertrofia celular e/ou nuclear e necrose focal, alterações nas mitocôndrias, grânulos com secreção, gotículas de lipídios, necrose celular e núcleo em processo de apoptose. Em todos os pontos foi observada uma prevalência de indivíduos com alterações moderadas. Os resultados da análise do IAH e da análise ultraestrutural demonstraram que as alterações dos pontos 1, 2, 3 e 4 foram classificadas como severas e as alterações dos pontos 5 e 6 como moderadas. Estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A análise físico-química da água demonstrou elevadas concentrações de íons ao longo do rio. Os resultados obtidos apontam que o rio Cachoeira está em processo de degradação, sendo o trecho entre as cidades de Itapé e Itabuna de pior qualidade ambiental.

Palavras-chave: Citologia, histopatologia, monitoramento ambiental, peixe.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the environmental quality of the Cachoeira river through physicochemical water, histopathological and ultrastructural analysis of liver of *Tilapia rendalli*. Samples were taken in six points, covering the counties of Itapé, Itabuna and Ilheus. The fish were collected with seine net and puça. It was used the routine histological technique of inclusion and embedding in paraffin. The analysis was made by light microscopy and the histopathological alterations were classified into mild, moderate and severe and evaluated semiquantitatively by Histopathological Alteration Index (HAI), based on the severity of the alterations. For ultrastructural analysis, the livers were fixed in glutaraldehyde, embedded in resin, sectioned, contrasted with 0.5% uranyl and they were analyzed in a transmission electron microscope. Water samples were collected and were taken parameters of pH, temperature, dissolved oxygen, turbidity and conductivity. Tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare the results. Both the histological and the ultrastructural analysis showed alterations. The main changes were: rectilinear blood vessels, vacuolization and/or degeneration of the cytoplasm, picnotic nuclei, cellular hypertrophy and/or nuclear and focal necrosis, alterations in mitochondria, secretory granules, lipids droplets, cellular necrosis and nucleus in apoptosis process. At every point it was observed a prevalence of individuals with moderate alterations. The results of the analysis of the AHI and ultrastructural analysis demonstrated that alterations in points 1, 2, 3 and 4 were classified as severe and alterations in points 5 and 6 as moderate. These results showed no statistically significant difference between the points. The physical-chemical analysis of the water showed high concentrations of ions along the river. The results obtained indicate that the Cachoeira river is in process of degradation, and that the points located between the counties of Itapé and Itabuna have the worst environmental quality.

Keywords: Cytology, histopathology, environmental monitoring, fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	(Introdução Geral) Exemplar da espécie <i>Tilapia rendalli</i> coletada no rio Cachoeira.....	4
Figura 2.	(Área de estudo) Mapa da Bahia e, no detalhe, a bacia hidrográfica do rio Cachoeira, mostrando os pontos de amostragem.....	8
Figura 3.	Bacia hidrográfica do rio Cachoeira, mostrando os pontos de amostragem.....	11
Figura 1.	(Artigo) Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Cachoeira, Bahia, Brasil.....	22
Figura 2.	Análise de Componentes Principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos amostrados no rio Cachoeira.....	28
Figura 3.	Microscopia ótica do fígado de <i>Tilapia rendalli</i> . Fotografias de fígado próximo do normal e com alterações histopatológicas.....	31
Figura 4.	Microscopia ótica do fígado de <i>Tilapia rendalli</i> . Fotografias de fígado com alterações histopatológicas.....	32
Figura 5.	Frequência de intensidade das alterações histopatológicas observadas no fígado de <i>Tilapia rendalli</i> por ponto de amostragem no rio Cachoeira.....	33
Figura 6.	Médias de Índice de Alteração Histopatológica (IAH) no fígado de <i>Tilapia rendalli</i> nos pontos amostrados no rio Cachoeira.....	33
Figura 7.	Microscopia do fígado de <i>Tilapia rendalli</i>	35
Figura 8.	Microscopia do fígado de <i>Tilapia rendalli</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Classificação da intensidade das alterações histopatológicas observadas no fígado de <i>Tilapia rendalli</i>	24
Tabela II.	Descrição da situação histopatológica do órgão, de acordo com os valores do IAH.....	25
Tabela III.	Análise dos parâmetros físico-químicos da água coletada nos seis pontos amostrados no rio Cachoeira.....	27
Tabela IV.	Frequência dos diferentes tipos de alterações histopatológicas por ponto de amostragem.....	30

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Objetivos.....	7
Objetivo geral.....	7
Objetivos específicos.....	7
2. ÁREA DE ESTUDO.....	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
 ARTIGO: Análise histológica e de ultraestrutural em <i>Tilapia rendalli</i> como instrumento de avaliação ambiental do rio Cachoeira, Bahia, Brasil	 18
RESUMO.....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Área de estudo.....	21
Amostragem.....	22
Análise físico-química.....	23
Análise histopatológica.....	23
Análise ultraestrutural.....	25
Análise Estatística.....	26
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO (Normas da revista).....	46

1. INTRODUÇÃO GERAL

Em todo o mundo, o uso humano e o mau planejamento na utilização da água têm contribuído para a poluição de rios, lagos e águas subterrâneas com efeitos negativos sobre os ecossistemas naturais (OLANIKE, 2003). Os sistemas aquáticos, devido à interferência das ações antrópicas, atualmente vêm sofrendo alterações drásticas, como a crescente contaminação da água, uma vez que os rios têm sido pontos de captação de água para abastecimento de áreas metropolitanas, servindo de receptores para os lançamentos de esgotos urbanos, de lixo e de efluentes agro-industriais, o que tem ocasionado a degradação deste ambiente (SILVA, 2010a).

A maioria dos países, inclusive o Brasil, tem como principais causadores de poluição dos seus rios, mares e lagos, a falta de um saneamento básico adequado, com esgotos urbanos não tratados, dejetos industriais e produtos químicos (VALENÇA, 2003). Além disso, os ambientes aquáticos atuam como receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, uma vez que são susceptíveis à ação de poluentes aéreos, que chegam aos corpos d'água por deposição atmosférica e contaminantes terrestres que são transportados aos ecossistemas aquáticos por meio do escoamento das chuvas (DOMINGOS, 2006). Muitos desses poluentes são extremamente tóxicos para os organismos, se constituindo numa grave ameaça à biodiversidade destes ambientes (FREIRE et al., 2008).

A freqüente exposição dos indivíduos destes ambientes a compostos químicos orgânicos é capaz de fazer com que os mesmos interajam com os poluentes, causando múltiplas alterações que podem gerar graves conseqüências em populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (JESUS & CARVALHO, 2008). Devido a essa interação, a exposição dos organismos aos efeitos de poluentes em ambientes degradados têm sido alvo de muitos estudos por parte dos toxicologistas ambientais (VAN DER OOST et al., 2003).

Diante da problemática ambiental que os ecossistemas aquáticos vêm enfrentando, a realização de estudos de monitoramento de qualidade ambiental é de fundamental importância, sendo que para Vieira & Shibatta (2007), avaliar as condições de um ecossistema aquático não é uma tarefa simples e Buss et al. (2003) salientaram que é fundamental o desenvolvimento de medidas consistentes e eficazes a fim de que a qualidade desses rios seja preservada.

As avaliações de impacto ambiental são normalmente realizadas através de parâmetros físico e químicos da água e para autores como Buss et al. (2003), apenas o uso desta metodologia tradicional não é suficiente para se avaliar a qualidade de um ambiente, uma vez que as análises físicas e químicas fornecem uma informação momentânea acerca do ambiente. Boff (2010) menciona que essas análises convencionais não refletem as reais condições do ambiente amostrado, uma vez que devido à correnteza, a água dos rios está em constante processo de renovação.

Freire et al. (2008) salientaram que isto não significa que as análises físico-químicas da água não sejam relevantes, mas que não é adequado avaliar as condições de um ambiente possivelmente impactado com base apenas nas informações oriundas dessas análises. Arias et al. (2007) afirmam que para se obter respostas mais consistentes acerca das condições de um ambiente aquático é essencial agregar metodologias, unindo os resultados obtidos através das ferramentas convencionais com as respostas encontradas por meio de outros métodos.

Desta forma, atualmente, o monitoramento biológico tem sido bastante utilizado para avaliar a qualidade das águas, sendo que este método pode ser mais eficaz que o monitoramento físico e químico tradicional, uma vez que pode apontar alterações ambientais a longo prazo e refletir os efeitos de contaminantes presentes em pequenas concentrações e que não são detectáveis em análises convencionais (QUEIROZ, 2004). O biomonitoramento é uma ferramenta que permite verificar o impacto de componentes externos sobre os ecossistemas e também as diferenças entre um local e outro (LAZORCHAK et al., 2002). Neste sentido, Monteiro et al. (2008) salientaram que um crescente interesse no estudo de organismos como bioindicadores tem sido observado, principalmente em função da facilidade de aplicá-los em monitoramentos ambientais.

O biomonitoramento no estudo de ambientes aquáticos tem apresentado resultados satisfatórios, uma vez que quando expostos a substâncias tóxicas, os animais têm a tendência a apresentarem algum tipo de resposta biológica que pode ser mensurada, funcionando estas espécies como bioindicadores (SILVA, 2010b). Os bioindicadores são organismos que refletem de alguma maneira a qualidade do ambiente (LAZORCHAK et al. 2002) e que em distintos níveis da organização biológica fornecem informações adicionais e relevantes para a avaliação de risco ecológico (ARIAS et al., 2007). Os mesmos autores salientam ainda que o biomonitoramento é uma metodologia de grande relevância, uma vez que a biota aquática está

constantemente exposta a um elevado número de elementos tóxicos descartados no ambiente. Da mesma forma, Silva(2004) salientou que quando organismos são expostos a ambientes muito perturbados, os efeitos dos poluentes podem ser drásticos, podendo gerar até danos letais imediatos.

Macroinvertebrados bentônicos, peixes e perifíton estão dentre os grupos de organismos mais utilizados como bioindicadores de qualidade das águas (GOULART & CALISTO, 2003), sendo que os peixes são sugeridos como bons bioindicadores por possuírem mecanismos celulares de resposta ao estresse químico e constituírem um relevante elo entre diferentes níveis tróficos (SILVA, 2010b).

Algumas espécies de peixes apresentam características que as tornam boas indicadoras, como a tolerância a ambientes com baixo teor de oxigênio e a ampla distribuição geográfica (LINS et al., 2010), além de apresentar fisiologicamente vários mecanismos de resposta biológica(JENKINS, 2004). Karr (1981) afirma que as comunidades de peixes podem fornecer informações relevantes acerca das condições de um ambiente aquático, o que as tornam excelentes indicadores de qualidade ambiental. Vários estudos têm utilizado peixes como bioindicadores de ambientes aquáticos, obtendo respostas satisfatórias acerca das condições do ambiente monitorado (CANAPA et al., 2002; STENTIFORD et al., 2003; VIEIRA & SHIBATA, 2007).

Flores-Lopes et al. (2007a) salientaram que, nos últimos anos, tem crescido a utilização de peixes como indicadores biológicos em testes de toxicidade em laboratório e em programas de monitoramento da qualidade dos ambientes aquáticos, uma vez que os estudos realizados com estes organismos resultam em importantes dados para a avaliação destes ambientes. Chagas (2008) salientou que informações sobre bioconcentrações e bioacumulações de poluentes proporcionam subsídios para um diagnóstico mais eficaz dos impactos ambientais, assim como um melhor entendimento das relações entre a poluição e o seu efeito na biota.

A *Tilapia rendalli*(Boulenger, 1896) (Teleosteo: Perciformes: Cichlidae), popularmente conhecida como Tilapia do Congo,é uma espécie de origem africana, considerada uma excelente espécie sentinela, uma vez que é resistente a doenças e sobrevive em ambientes com pouco teor de oxigênio dissolvido (HAUSER-DAVIS et al., 2010). Com relação ao hábito alimentar, ela é considerada onívora e oportunista, podendo ingerir uma grande diversidade de itens alimentares que variam desde zooplâncton a insetos aquáticos (WEYL & HECHT, 1998), sendo que essa

capacidade está associada com a facilidade de fertilizá-la em cativeiro, o que tem feito com que esta espécie seja considerada de grande interesse mundial (HAUSER-DAVIS et al., 2010) e uma das espécies exóticas mais cultivadas no Brasil, sendo estas de grande relevância para o aproveitamento das plantas aquáticas dos grandes reservatórios e pequenos açudes (CÂMARA, 2004) (Figura 1).



Figura 1: Exemplar da espécie *Tilapia rendalli* coletada no rio Cachoeira. Comprimento Padrão - 44,14 mm.

Atualmente, a utilização de ferramentas como biomarcadores, que são alterações biológicas em níveis organizacionais menos complexos (molecular, bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental) e são provenientes da ação de contaminantes químicos presentes no ambiente vem sendo utilizada a fim de se avaliar a qualidade das águas (FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005). Desta forma, estas respostas biomarcadoras se constituem em importantes fontes de informação acerca das condições ambientais (ADEDEJI et al., 2012).

O uso de biomarcadores tem sido considerado como uma estratégia promissora, já que esta permite detectar a presença de agentes estressores de forma preditiva (NASCIMENTO et al., 2006; FREIRE et al., 2008) e em estudos de toxicidade no nível sub-orgânico (bioquímico, fisiológico e histológico), sendo considerado mais viável para se avaliar os efeitos de contaminantes, uma vez que as respostas aos estressores são mais rápidas (SILVA, 2004). Essa afirmação é confirmada por Kohler et al. (1992), para quem o uso de métodos biológicos sensíveis são fundamentais na identificação precoce de alterações que precedem lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em programas de monitoramento.

O biomarcador histopatológico é um método rápido na detecção dos efeitos originados pela exposição dos indivíduos a algum agente estressor, sendo bastante relevante para identificar efeitos destes agentes no ambiente aquático, uma vez que fornece informações em nível de órgãos e tecidos (HINTON et al., 1992). As análises histopatológicas de órgãos-alvo se constituem numa maneira sensível de detecção dos efeitos diretos de compostos químicos, tanto em pesquisas de laboratório como em campo (SANTANA, 2004).

Além disso, os biomarcadores histopatológicos permitem detectar tanto os efeitos agudos como os de duração crônica causados pela exposição a um determinado poluente, sendo que é possível encontrar alterações nos indivíduos mesmo após a exposição destes a um agente estressor (VAN DER OOST et al., 2003). Desta forma, a análise histopatológica tem sido considerada como uma excelente ferramenta para avaliações de impactos ambientais em populações de peixes (TEH et al., 1997; ABDEL-MONEIM & ABDEL-MOHSEN, 2010; PERENDIJA et al., 2011).

Para Bernet et al. (1999), a histologia representa um método eficiente na detecção de efeitos tóxicos de algum agente estressor em uma variedade de tecidos e órgãos que tendem a sofrer alguns danos que podem causar modificações na estrutura do tecido e até mesmo comprometer todo o funcionamento do órgão (BALULA, 2011).

O fígado é um órgão essencial no que diz respeito a ação dos poluentes químicos sobre o peixe (SILVA, 2004), uma vez que este é multifuncional e portanto é de extrema relevância para a sobrevivência de um indivíduo, atuando no metabolismo de proteínas, lipídios e hidratos de carbono (BALULA, 2011) e nos processos de desintoxicação de substâncias tóxicas do organismo (REZENDE, 2011). Esse órgão, conforme Jenkins (2004) é responsável também pela produção de vitelogenina e armazenamento de glicogênio como reserva de energia.

O fígado pode ser considerado um órgão-alvo em ambientes degradados devido à sua grande importância no metabolismo de xenobióticos e sua alta sensibilidade a esses compostos (SIMONATO, 2006). A presença de alterações histopatológicas nesse órgão demonstra problemas no metabolismo hepático, indicando que o mesmo está sendo, possivelmente, exposto a um agente estressor presente na água (CAMARGO & MARTINEZ, 2007). Desta forma, as alterações hepáticas são excelentes ferramentas para refletir a qualidade de um ambiente aquático, possibilitando descrever os efeitos causados por poluentes (ABDEL-MONEIM et al. 2012) e este órgão é cada vez mais utilizado como biomarcador histopatológico de vários estudos

a fim de avaliar os efeitos de contaminantes em ambientes aquáticos (FLORES-LOPES et al., 2007b; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; ROCHA et al., 2010; PAULO et al., 2011) e tem sido cada vez mais utilizado em programas de biomonitoramento ambiental em função de fornecer resultados satisfatórios na avaliação de ambientes degradados (BALULA, 2011).

Além do uso de alterações teciduais como biomarcadores de monitoramento e avaliação ambiental, os biomarcadores moleculares/celulares vêm sendo utilizados para identificar a presença ou ausência de agentes estressores (JESUS & CARVALHO, 2008), se mostrando excelentes ferramentas na detecção de possíveis agentes estressores em ambientes aquáticos, uma vez que estas apresentam respostas que permitem caracterizar as condições de saúde de um organismo (GERNHÖFER et al., 2001). Freire et al. (2008), afirmam que as respostas citológicas têm sido muito utilizadas como biomarcadores de qualidade ambiental e vários estudos utilizando a citologia como um indicativo de poluição ambiental vem sendo desenvolvidos (STEHR et al., 1998; GERNHÖFER et al., 2001; MARIGÓMEZ et al., 2006; ABDEL-MONEIM & ABDEL-MOHSEN, 2010).

Entre as organelas mais vulneráveis a alterações, atuando como biomarcadores podem ser destacados os lisossomos, onde as membranas lisossômicas são consideradas bastante sensíveis a poluentes (NASCIMENTO et al., 2006). Freire et al. (2008) afirmaram que os lisossomos têm a capacidade de acumular algumas substâncias tóxicas que podem ser bastante prejudiciais a membrana lisossomal. Outras organelas podem também apresentar alterações, sendo então utilizadas como biomarcadoras de ambientes aquáticos contaminados, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e perioxissomos, podendo ser observado também outras estruturas como o núcleo e a compartimentalização do citoplasma (GERNHÖFER et al., 2001).

Para Jesus & Carvalho (2008), as informações obtidas através de análises histopatológicas e de ultraestrutura podem ser utilizadas positivamente para avaliar a situação ambiental dos ecossistemas aquáticos, fornecendo subsídios para os órgãos ambientais tomarem medidas mitigadoras a fim de evitar uma maior degradação destes ambientes. A eficácia destes biomarcadores cito-histológicos em estudos de biomonitoramento ambiental já tem sido testada e aprovada por vários estudiosos.

Estudos recentes demonstraram que a bacia do rio Cachoeira, Bahia, vem sendo fortemente impactada por atividades antrópicas e se encontra em processo de degradação. Ao utilizar macrófitas aquáticas como bioindicadoras de qualidade ambiental, Klumpp et al. (2002)

perceberam a presença de alguns metais no rio, como cobre, cromo e alumínio e a eutrofização da água deste ambiente. Mangabeira et al. (2004) verificaram elevada concentração de cromo nas raízes de *Eichhornia crassipes*, indicando que o rio apresenta algum grau de contaminação.

Lucio et al. (2012) observaram que o rio Cachoeira se encontra em processo de deterioração em função de terem sido observadas elevadas concentrações de nutrientes ao longo do mesmo e Pinho (2001) já havia observado uma elevada concentração de fósforo ao longo do rio. Este processo de degradação também foi verificado por Paulo et al. (2012), que observaram a presença de alterações histopatológicas severas no fígado de *Poecilia vivipara*, indicando que essa espécie estava sofrendo a ação de algum agente estressor.

Desta forma, se pressupõe que o rio Cachoeira se encontra em um processo de degradação ambiental, sendo essencial a realização de mais estudos que visem verificar o grau de degradação deste ambiente, agregando informações obtidas por meios de diferentes ferramentas de análise.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a qualidade ambiental do rio Cachoeira por meio da análise físico-química da água, histopatológica e de ultraestrutura em fígados da espécie *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897).

2.2. Objetivos Específicos:

- Verificar a ocorrência e o grau de severidade das alterações histopatológicas observadas no fígado de *Tilapia rendalli*;
- Identificar a presença de alterações ultraestruturais nas células do fígado de *Tilapia rendalli*;
- Identificar, através da análise físico-química da água, quais parâmetros estão influenciando na qualidade do corpo hídrico;
- Relacionar os resultados das análises histopatológicas e de ultraestrutura com os resultados físico-químicos.

3. ÁREA DE ESTUDO

3.1. O rio Cachoeira

A Bacia Hidrográfica do rio Cachoeira (BHRC) está localizada no sul da Bahia, Brasil ($14^{\circ} 42' - 15^{\circ} 20' S$ e $39^{\circ} 01' - 40^{\circ} 09' W$) e apresenta como limites as bacias dos rios de Contas e Almada, ao norte; as bacias dos rios Pardo e Una ao sul; a bacia do rio Pardo, a oeste e o Oceano Atlântico a leste (TRINDADE, 2008). O rio Cachoeira é formado pela junção dos rios Colônia e Salgado, banhando os municípios de Itapé, Itabuna e Ilhéus (NACIF, 2000) (Figura 2).

A nascente está localizada numa altitude de 800 m, na Serrada Ouricana (município de Itororó) e atinge o seu patamar mais baixo na superfície litorânea do município de Ilhéus (NACIF et al., 2003). A sua área de drenagem é equivalente a 4.600 Km^2 e abrange cerca de 12 municípios: Firmino Alves, Floresta Azul, Jussari, Itajú do Colônia, Ibicaraí, Ilhéus, Itabuna, Itapé, Itapetinga, Itororó, Lomanto Júnior e Santa Cruz da Vitória, sendo estes povoados por aproximadamente 600.000 habitantes (TRINDADE, 2008).

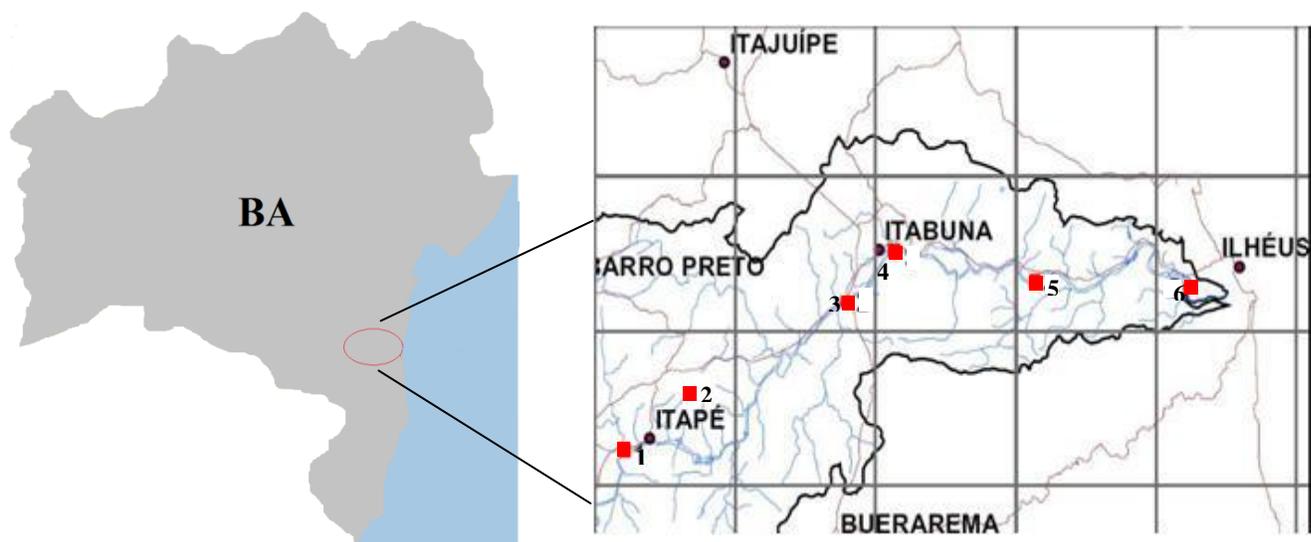


Figura 2: Mapa da Bahia e, no detalhe, a bacia hidrográfica do rio Cachoeira, mostrando os pontos de amostragem.

O clima local se caracteriza por ser úmido e sub-úmido e as temperaturas médias anuais variam entre 22° e 25° C (OLIVEIRA & ROCHA, 2007) e a precipitação possui uma variação média anual de 800 mm nas cabeceiras dos rios Colônia e Salgado, municípios de Itapetinga e Itororó, até acima de 2000 mm na região costeira (PINHO, 2001), sendo que essas variações pluviométricas são determinadas pelo relevo (NACIF et al., 2003).

O rio Cachoeira historicamente e socioeconomicamente é de grande importância para a região sul da Bahia, uma vez que esteve relacionado com a principal fonte de renda da região, sendo esta a monocultura do cacau (MANGABEIRA et al., 2004). Atualmente a bacia do rio Cachoeira tem sido utilizada por produtores rurais para a criação de gado e na cultura de cacau, mandioca e milho e também como um local de abastecimento de água para as comunidades ribeirinhas (SCHIAVETTI et al., 2002), indicando que este recurso hídrico vem sendo explorado pelas atividades humanas.

3.1.2. Locais de amostragem

O ponto 1 (14 ° 53 '934 "S e 39 ° 25' 781" W) foi estabelecido em um distrito chamado de Estiva, que faz parte ao município de Itapé (Figura 1). É um ambiente com águas rasas, escuras e possui correntezas com velocidade média. O substrato é rochoso e pedregoso, possuindo muita vegetação marginal e uma quantidade moderada de vegetação dentro do leito do rio. É uma área distante de áreas urbanas, sendo aparentemente pouco impactada por atividades antrópicas. Este ponto segundo Lucio et al. (2012), é caracterizado por apresentar um predomínio de áreas de pastagens (Figura 3A).

O ponto 2 (14 ° 52 '719 "S e 39 ° 24' 772" W) está situado na Vila de Itapé, localizado no município de Itapé (Figura 1). Este ponto é na sua maior parte semelhante a um remanso de águas lentas, porém em alguns locais pode ser observado pequenas correntezas. Podem ser observados locais rasos e outros mais profundos e uma vegetação marginal e emergente em quantidade moderada. O substrato é rochoso, pedregoso e em algumas áreas arenoso. Está crescente o processo de urbanização nas suas proximidades, sendo observada a presença de casas e estabelecimentos comerciais, assim como a prática de pesca (Figura 3B).

O ponto 3 (14°52'72,5"S e 39°21'77,7"W) localiza-se na Fazenda Santa Amélia, distrito de Ferradas, pertencente a cidade de Itabuna (Figura 1). É um ambiente com águas escuras, rasas

em alguns locais e fundas em outros. Apresenta uma correnteza com velocidade média, porém ocorrem alguns locais com água parada. Possui uma vegetação marginal, flutuante e uma mata ciliar consideravelmente preservada. O seu substrato é arenoso e pedregoso. Este ponto fica em uma área de fazendas, distante de locais habitados e com acesso bastante restrito. Entretanto, este ponto recebe a influência de descargas industriais, devido a existência de fábricas de alimentos próximo a área estudada, além de existir também um matadouro local (PAULO et al., 2012) (Figura 3C).

O ponto 4 ($14^{\circ} 47' 20''$ S e $39^{\circ} 15' 41''$ W) está localizado em frente ao Jardim das Acácias, situado em Itabuna (Figura 1). Este ambiente é constituído de águas rasas e escuras. Possui uma vegetação submersa, emergente e marginal, com árvores ao redor do curso da água. O seu substrato é rochoso e pedregoso e apresenta corredeiras com velocidade média. É perceptível a presença de rochas, sendo que estas são bastante expostas ao longo do leito. Esta é uma área visivelmente impactada por atividades humanas, sendo observada a presença de residências junto à margem. Além disto, este ponto por estar localizado próximo a uma área urbana atua como receptor de esgoto doméstico (LUCIO et al., 2012) (Figura 3D).

O ponto 5 ($14^{\circ} 47' 788''$ S e $39^{\circ} 12' 107''$ W) está situado próximo a um restaurante chamado de “Ponto do Pitu”, em Ilhéus (Figura 1). É um ambiente de águas escuras, rasas e profundas, dependendo do local. Esta é uma área, na sua maioria, de baixa correnteza. Possui uma vegetação marginal, rica em árvores e também emergente e flutuante. O seu substrato é rochoso, pedregoso e em alguns locais se observa a presença de um substrato arenoso. Este ponto é de fácil acesso, uma vez que fica próximo a rodovia Ilhéus-Itabuna, o que facilita o seu contato com pessoas e animais. Este ponto fica próximo a um perímetro urbano, sendo receptor de efluentes domésticos e industriais (PAULO et al., 2012) (Figura 3E).

O ponto 6 ($14^{\circ} 47' 072''$ S e $39^{\circ} 06' 273''$ W) está localizado no Caminho das Sesmarias, no Bairro Banco da Vitória, pertencente ao município de Ilhéus (Figura 1). Este ambiente é estuarino e possui águas rasas em determinados locais e profundas em outros. Apresenta águas lentas, com pouca correnteza. O substrato é arenoso e rochoso e a vegetação marginal, com a presença de várias árvores (Figura 3F).



Figura 3. Locais de amostragem no rio Cachoeira. A) Ponto 1 – Estiva; B) Ponto 2 – Vila de Itapé; C) Ponto 3 – Ferradas; D) Ponto 4 – Jardim das Acácias; E) Ponto 5 – Ponto do Pitú e F) Ponto 6 – Banco da Vitória.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MONEIM, A. M. & ABDEL-MOHSEN, H. A. Ultrastructure changes in hepatocytes of catfish *Clarias gariepinus* from Lake Mariut, Egypt. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n. 5, p.715–720, 2010.

ABDEL-MONEIM, A. M.; AL-KAHTANI, M. A. & ELMENSHAWY, O. M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, v. 88, 1028–1035, 2012.

ADEDEJI, O. B.; OKERENTUGBA P. O. & OKONKO I. O. Use of Molecular, Biochemical and Cellular Biomarkers in Monitoring Environmental and Aquatic Pollution. **Nature and Science**, v. 10, n. 9, p. 83–104, 2012.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. de.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R. & BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.

BALULA, T. L. P. **Avaliação dos efeitos histológicos ao nível das brânquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após uma exposição a cloreto de benzalcônio**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 30 p., 2011.

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

BOFF, A. P. **Monitoramento Biológico da Qualidade da Água da Microbacia do Rio Tucano – Santa Terezinha de Itaipu - PR**. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) - Faculdade Dinâmica de Cataratas, Foz do Iguaçu, 50 p., 2010.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F. & NESSILIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 465–473, 2003.

CÂMARA, M. R. da. **Biologia reprodutiva do ciclídeo neotropical ornamental acará disco, *Symphysodon discus* Heckel, 1840 (Osteichthyes: Perciformes: Cichlidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 135 p., 2004.

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

CANAPA, A.; BARUCCA, M.; CELESTE, A.; OLMO, E. & REGOLI, F. Preliminary investigations on vitellogenin m-RNA induction in some bioindicator Mediterranean fish species. **Marine Environmental Research**, v. 54, 673–677, 2002.

CHAGAS, G. C. da. **Avaliação do potencial bioindicador de *Trichodactylus fluviatilis* (Latreille, 1828) (Crustacea: Decapoda: Trichodactylidae) na bacia do rio Corumbataí.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro - Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 61 p., 2008.

DOMINGOS, F. X. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, 118 p., 2006.

FLORES-LOPES, F. & MALABARBA, L. R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 166–172, 2007a.

FLORES-LOPES, F. & MALABARBA, L. R. Revisão de alguns aspectos da assembléia de peixes utilizados em programas de monitoramento ambiental. **Vittale**, Rio Grande, v. 19, n. 1, p. 45–58, 2007b.

FONTAÍNHAS-FERNADES, A. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos, Vila Real, Portugal, v. 7, n. 1, p. 67–86, 2005.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F. & ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 347–354, 2008.

GERNHÖFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M. MÜLLER, E. & TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v. 8, p. 241–260, 2001.

GOULART, M. D. C. & CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, n. 1, 2003.

HAUSER-DAVIS, R. A.; OLIVEIRA, T. F.; SILBEIRA, A. M.; SILVA, T. B. & ZIOLLI, R. L. Case study: Comparing the use of nonlinear discriminating analysis and Artificial Neural Networks in the classification of three fish species: acarás (*Geophagus brasiliensis*), tilapias (*Tilapia rendalli*) and mullets (*Mugil liza*). **Ecological Informatics**, v. 5, p. 474–478, 2010.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A. & OKIHIRO, M. S. Histopathologic biomarkers. In: Hugget, R., R. Kimerle, P. Mehrle & H. Bergman (Eds.). **Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton, Lewis Publishers, p. 155–195, 1992.

JENKINS, J.A. Fish bioindicators of ecosystem condition at the Calcasieu Estuary, Louisiana. In: National Wetlands Research Center, **USGS Open-File Report**, p. 1–47, 2004.

JESUS, T. B & CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680–693, 2008.

KARR, J.R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, v. 6, n. 6, p. 21–27, 1981.

KLUMPP, A.; BAUER, K.; FRANZ-GERSTEIN, C. & MENEZES, M. Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). **Environment International**, v. 28, n. 3, p. 165–171, 2002.

KOHLER, A.; DEISEMANN, H. & LAURITZEN, B. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 91, 141–153, 1992.

LAZORCHAK, J. M.; HILL, B. H.; BROWN, B. S.; MCCORMICK, F. H.; ENGLE, V.; LATTIER, D. J.; BAGLEY, M. J. & GRIFFITH, M. B. Maciorowski, A. F., Toth, G. P. USEPA biomonitoring and bioindicator concepts needed to evaluate the biological integrity of aquatic systems. In: Markert, B. A, Breure, A. M., Zechmeister, H. G. eds. **Bioindicators and biomonitoring: Principles, concepts and applications**. Elsevier, Boston, p. 831–874, 2002.

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

LUCIO, M. Z. T. P. Q. L.; SANTOS, S. S. & SILVA, D. M. L. Hydrochemistry of Cachoeira River (Bahia State, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 24, n. 2, p. 181–192, 2012.

MANGABEIRA, P. A. O.; LABEJOF, L.; LAMPERTI, A.; DE ALMEIDA, A-AF.; OLIVEIRA, A. H.; ESCAIG, F.; SEVERO, M. I. G.; SILVA, D. C.; SALOES, M.; MIELKE, M. S.; LUCENA, E. R.; MARTINS, M. C.; SANTANA, K. B.; GAVRILOV, K. L.; GALLE, P. & LEVI-SETTI, R. Accumulation of chromium in root tissues of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. in Cachoeira river-Brazil. **Applied Surface Science**, p. 231–232, 2004.

MARIGÓMEZ, I.; SOTO, M.; CANCIO, I.; ORBEA, A.; GARMENDIA, L. & CAJARAVILLE, M. P. Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 287–304, 2006.

MONTEIRO, T. R.; OLIVEIRA, L. G. & GODOY, B. C. Biomonitoramento da qualidade de água utilizando macroinvertebrados bentônicos: adaptação do índice biótico BMWP⁷ à Bacia do Rio Meia Ponte-GO. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 553–563, 2008.

NACIF, P. G. S. **Ambientes naturais da bacia hidrográfica do rio Cachoeira, com ênfase nos domínios pedagógicos**. Tese (Doutorado em Solos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2000.

NACIF, P. G. S. COSTA, L. M. da; SAADI, A.; FILHO, E. I. F.; KER, J. C.; COSTA, O. V.; MOREAU, M. S. **Ambientes naturais da Bacia Hidrográfica do Rio Cachoeira**. Cruz das Almas, Brasil, 2003.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A. & LEITE, M. B. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: P.A Zagatto & E. Bertoletti. (eds.). **Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações**, São Paulo, p. 413–431, 2006.

OLANIKE K. A. Consequences of pollution and Degradation of Nigerian Aquatic Environment on Fisheries Resources. **Environmental**. v. 23, n. 4, p. 297–306, 2003.

OLIVEIRA, P. C. & ROCHA, G. R. A. A ictiofauna do estuário do Rio Cachoeira (Ilhéus, Bahia) na primavera e no verão. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu – MG, 2007.

PAULO, D. V.; FONTES, F. M. & FLORES-LOPES, F. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 1–10, 2012.

PERENDIJA, B. R., Despotovic, S. G., Radovanovic, T. B., Gavric, J. P., Borković Mitic, S. S., Pavlovic, S. Z., Ognjanovic, B. I., Simic, S. B., Pajovic, S. B. & Saicic, Z. S. **Archives of Biologica Sciences**, Belgrade, v. 63, n. 4, p. 979–989, 2011.

PINHO, A. G. **Estudo da qualidade das águas do Rio Cachoeira-Região Sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 133 p., 2001.

QUEIROZ, E. P. **Contribuição ao uso de macroinvertebrados bentônicos no biomonitoramento da qualidade de água de ambientes lóticos no estado de Mato Grosso do Sul**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 73 p., 2004.

REZENDE, K. F. O. **Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 60 p., 2011.

ROCHA, R. M.; COLEHO, R. P.; MONTES, C. S.; SANTOS, S. S. D. & FERREIRA, M. A. P. Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) da Baía do Guarujá, Belém, Pará. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 101–109, 2010.

SANTANA, L. M. B. M. **Biomarcadores histopatológicos para o monitoramento ambiental da bacia do ribeirão Jacutinga (Londrina, PR)**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2004.

SCHIAVETTI, A., SCHILLING, A. C. & OLIVEIRA, H. T. Caracterização sócio-ambiental da bacia hidrográfica do rio Cachoeira Sul da Bahia, Brasil. In Schiavetti, A. & Camargo, A.F.M. **Conceitos de bacias hidrográficas: teorias e aplicações**, Ilhéus: Editus Editora, p. 141–161. (2002).

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

SILVA, A. da C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Perquirere - Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão da UNIPAM**. Patos de Minas: UNIPAM, v. 7, n. 1, p. 167–179, 2010a.

SILVA, J. C. da. **Biomarcadores morfológicos e análise química da bile em peixes para a avaliação da qualidade da água do Rio Iguacu**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná, 2010b.

SIMONATO, J. D. **Biomarcadores funcionais e histológicos associados a exposição do peixe *Prochilodus lineatus* ao óleo diesel**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de concentração Zoologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

STEHR, C. M.; JOHNSON, L. L. & MYERS, M. S. Hydropic vacuolation in the liver of three species of fish from the U.S. West Coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 32, p. 119–135, 1998.

STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M. & FEIST, F. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, n. 2, p. 137–159, 2003.

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicologic**, v. 37, p. 51–70, 1997.

TRINDADE, M. E. DE J. **Caracterização da assembléia de peixes no Ribeirão Limoeiro, bacia do Rio Cachoeira – BA**. Ilhéus, BA. Dissertação (Mestrado em Sistemas Aquáticos) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2008.

VALENÇA, J. F. S. **Rio Salgado: agente de agravos à saúde das populações ribeirinhas**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 109 p., 2003.

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

VIEIRA, D. B. & SHIBATTA, O. A. Peixes como bioindicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 57–65, 2007.

WEYL, O. L. F. & HECHT, T. The biology of *Tilapia rendalli* and *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) in a subtropical lake in Mozambique. **South African Journal of Zoology**, v. 33, p.178, 1998.

Artigo

Será submetido para o periódico - Environmental Monitoring and Assessment

ISSN 0167-6369

(Normas em anexo)

Análise histológica e ultraestrutural em *Tilapia rendalli* como instrumento de avaliação ambiental do rio Cachoeira, Bahia, Brasil

Milane Alves Correia¹, Daniela Mariano Lopes da Silva² e Fábio Flores-Lopes²

(1) Programa de Pós-Graduação em Zoologia Aplicada, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, CEP 45650-000, Ilhéus, BA, Brasil.

(2) Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, CEP 45650-000, Ilhéus, BA, Brasil.

Milane Alves Correia

Email: anne_mac2@hotmail.com

Resumo

Devido à degradação do ecossistema aquático, estudos de monitoramento ambiental têm sido desenvolvidos com o auxílio de ferramentas convencionais e biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade ambiental do rio Cachoeira, Bahia, Brasil por meio de análises físicos e química da água, histopatológica e ultraestrutural do fígado de *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897). Foram coletadas amostras de água para a análise físico-química e de peixes para as análises histopatológicas e ultraestruturais. As amostragens foram realizadas em seis pontos nos municípios de Itapé, Itabuna e Ilhéus, entre 2010 e 2012. Foi utilizado rede de arrasto do tipo picaré e puçá para a coleta dos exemplares, que foram fixados em formol a 10%. Para a análise histológica foi utilizada a técnica de inclusão e impregnação em parafina e com coloração de hematoxilina-eosina (H&E). Para análise de ultraestrutura foi aplicada a técnica de inclusão e impregnação em resina Epon e secção e contraste com uranila a 0,5%. As análises histopatológicas foram realizadas semi-quantitativamente, baseando-se na severidade das alterações. Foi observado na água elevadas concentrações de nutrientes e em todos os pontos amostrados os indivíduos analisados apresentaram alterações histopatológicas e ultraestruturais. Os pontos 1, 2, 3 e 4 foram caracterizados como moderados e severos tanto para a histopatologia quanto para a ultraestrutura, indicando que estes pontos apresentam maior degradação em relação aos demais. Em função disto, pode ser inferido que as condições ambientais do rio Cachoeira são preocupantes, uma vez que a saúde da *Tilapia rendalli* deste ambiente estão sofrendo a ação da presença de uma variedade de agentes estressores.

Palavras-chave: Histopatologia, monitoramento ambiental, peixes, ultraestrutural.

Introdução

Os ambientes aquáticos vêm sendo afetados pelas atividades antrópicas, resultando em prejuízos para os organismos que habitam estes ecossistemas (Moraes e Jordão 2002; Abdel-Moneim e Abdel-Mohsen 2009). Devido a freqüente exposição desses sistemas aquáticos a poluentes, é essencial que seja realizado nestes ecossistemas estudos de monitoramentos ambientais (Arias et al. 2007).

As análises físico-químicas em programas que avaliam as condições de um ambiente aquático são de grande relevância, mas de acordo com Jenkins (2004), somente o uso desta ferramenta pode fornecer informações errôneas acerca das condições ecológicas e biológicas do ecossistema aquático, sendo essencial também o uso de dados biológicos. O uso de indicadores biológicos em estudos de avaliação da qualidade ambiental tem sido uma excelente ferramenta, porque permite inferir sobre as condições dos ambientes através das respostas dos organismos (Goulart e Callisto 2003), uma vez que os mesmos estão em contato direto com o ambiente (Vieira e Shibatta 2007). Os peixes são excelentes organismos bioindicadores das condições de um ecossistema aquático por, entre outras razões, serem abundantes e sensíveis aos agentes contaminantes (Karr, 1981).

Quando expostos a um agente estressor, os peixes apresentam alterações biológicas que permitem avaliar a real situação do seu habitat, sendo essa alteração considerada como um biomarcador (Nogueira et al. 2009). Os biomarcadores histopatológicos são ferramentas sensíveis que permitem avaliar e diagnosticar a presença de poluentes em um ambiente (Lins et al. 2010), por meio de alterações observadas nos órgãos dos peixes. Jesus e Carvalho (2008) afirmam que através das alterações observadas nas análises histopatológicas em órgãos-alvo é possível identificar a presença de poluentes na água e os efeitos que estes têm causado nos peixes.

Os biomarcadores citológicos são excelentes indicadores de que o meio aquático e conseqüentemente os organismos que ali vivem estão sendo expostos a algum agente estressor, permitindo relacionar as alterações observadas nas células dos indivíduos com o ambiente (Au et al. 1999). Em função de vários estudos terem sido realizados com resultados satisfatórios, o uso de biomarcadores ultraestruturais tem sido frequentemente utilizado a fim de avaliar a qualidade ambiental (Gernhöfer et al. 2001; Martins et al. 2005; Abdel-Moneim e Abdel-Mohsen 2009; Perendija et al. 2011).

O fígado é considerado um órgão-alvo eficiente no que se refere à detecção de alterações associadas à presença de poluentes no ambiente, uma vez que este órgão atua no metabolismo, agindo na excreção de xenobióticos (Figueiredo-Fernandes et al. 2007) e exerce a função de desintoxicação (Perendija et al. 2011). Devido a esta função, alterações observadas no fígado tem sido relacionadas com a degradação ambiental (Stentiford et al. 2003; Camargo e Martinez 2007; Rocha et al. 2010; Paulo et al. 2012).

A Bacia Hidrográfica do rio Cachoeira, Bahia, tem sido afetada negativamente por atividades antrópicas, sendo observada neste ambiente a presença de metais e elevadas concentrações de nutrientes (Pinho 2001; Klumpp et al. 2002; Lucio et al. 2012). Para avaliar esta bacia, foi escolhida a espécie *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1896) (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) em função de ser constante e abundante durante todo o período de amostragem. Conhecida como Tilápia do Congo, são peixes de água doce bastante resistente a doenças, sobrevivendo em ambientes com pouco teor de oxigênio dissolvido, o que a torna excelente espécie sentinela (Hauser-Davis et al. 2010).

Este estudo objetivou avaliar a qualidade ambiental do rio Cachoeira através das análises físicos e química da água, histopatológica e de ultraestrutura em fígados da espécie *Tilapia rendalli*.

Material e Métodos

Área de Estudo

A bacia Hidrográfica do rio Cachoeira está localizada na região sul do estado da Bahia, Nordeste do Brasil, entre as coordenadas (14 ° 42' / 15 ° 20 'S e 39 ° 01' / 40 ° 09' W) e possui uma área de drenagem com cerca de 4.830 Km², abrangendo treze municípios distribuídos entre as micro regiões de Ilhéus-Itabuna e Itapetinga (Schiavetti et al. 2002). A bacia esta limitada ao norte pelas bacias dos rios de Contas e Almada, ao sul pelas bacias dos rios Pardo e Una, a oeste pela bacia do rio Pardo e a leste pelo Oceano Atlântico (Cetra et al. 2009) (Fig. 1).

O rio Cachoeira é de grande relevância econômica, demográfica e social para os municípios que banha, uma vez que é utilizado para abastecimento urbano e industrial, pesca e como receptores dos esgotos de despejos domésticos e resíduos sólidos, sendo considerado um sistema sócio ecológico de grande relevância para a região (Nacif et al. 2000).

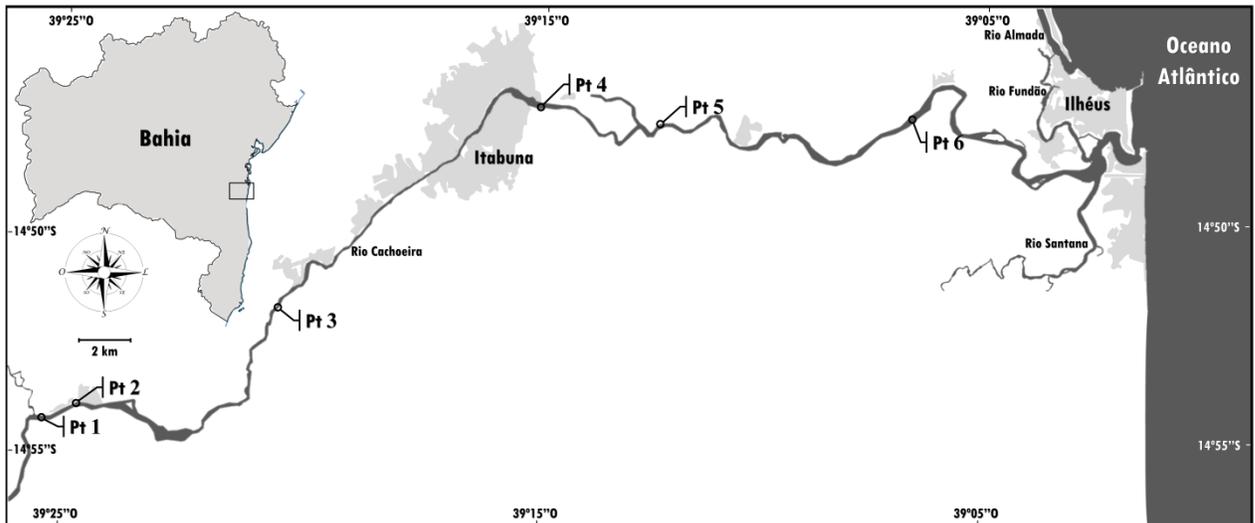


Figura 1: Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Cachoeira, Bahia, Brasil. Pt 1 - Estiva ($14^{\circ} 53' 934''$ S e $39^{\circ} 25' 781''$ W); Pt 2 - Vila de Itapé ($14^{\circ} 53' 934''$ S e $39^{\circ} 25' 781''$ W); Pt 3 - Ferradas ($14^{\circ} 52' 719''$ S e $39^{\circ} 24' 772''$ W); Pt 4 - Jardim das Acácias - Itabuna ($14^{\circ} 47' 20''$ S e $39^{\circ} 15' 41''$ W), Pt 5 - Ponto do Pitú ($14^{\circ} 47' 788''$ S e $39^{\circ} 12' 107''$ W) e Pt 6 - Banco da Vitória ($14^{\circ} 47' 072''$ S e $39^{\circ} 06' 273''$ W).

Amostragem

As amostragens foram realizadas trimestralmente durante o período de três anos (2010, 2011 e 2012), com rede de arrasto do tipo picaré ($5,5 \text{ m} \times 1,5 \text{ m} \times 0,5 \text{ cm}$) e puçá (Malabarba e Reis 1987). Foram realizadas sete coletas em seis pontos ao longo do rio Cachoeira, entre as cidades de Itapé e Ilhéus.

Os exemplares foram anestesiados com a substância MS222 (Tricaína metano sulfonato) e, depois de mortos, foram fixados ainda em campo em formol a 10%. Em seguida, os exemplares foram preservados em álcool 70% e, posteriormente, identificados até o nível de espécie. Foram tomadas as medidas de comprimento padrão (CP) e peso total (PT), com o auxílio de um paquímetro digital e uma balança digital de precisão.

Análise físico-química

Para análise físico-química da água foram tomadas, ainda em campo, as medidas do potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, oxigênio dissolvido (OD), turbidez e condutividade elétrica com o auxílio de um equipamento multiparâmetros da marca Horiba.

Para determinar a presença de matéria orgânica e de metais no ambiente, foram coletadas em todos os pontos amostras de água que foram armazenadas em frascos de polietileno, anteriormente lavados com HCl 1:1 e água destilada, e conduzidas, dentro de um isopor, ao Laboratório de Biogeoquímica Marinha (UESC).

No laboratório as amostras foram filtradas por meio de filtros de fibra de vidro tipo GF/F (0,7 µm) de 47 mm de diâmetro previamente calcinados em 450°C, sendo posteriormente feita a análise do material filtrado (dissolvido). As concentrações dos cátions e ânions (Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^+ , Na^+ , Cl^- , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} , SO_4^{-2}) foram determinadas por cromatografia iônica em DIONEX ICS 1000.

Análise histopatológica

Para a análise de microscopia ótica foram selecionados aleatoriamente, quando possível, dez indivíduos de cada ponto de amostragem e foi utilizada a técnica histológica de rotina de inclusão e impregnação em parafina. Cortes seriados, com espessura variando de 5 a 7 micrômetros foram realizados em um micrótomo. Para visualização geral dos tecidos e órgãos afetados foi utilizada a técnica de coloração de hematoxilina-eosina (H&E).

As alterações histopatológicas foram caracterizadas em: Alteração leve (1) - mudanças que não danificam os tecidos do fígado de tal maneira que uma melhoria nas condições ambientais permita a reestruturação e retomada da função do órgão. Alteração moderada (2) – mudanças que são mais severas e que conduzem a efeitos nos tecidos associados ao funcionamento do órgão; são lesões reparáveis e ocorrem em praticamente toda a superfície do fígado. Alteração severa (3) – a recuperação da estrutura do fígado não é possível, mesmo com uma melhoria da qualidade da água ou término da exposição a um estímulo tóxico (Modificado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic 1994).

A existência de alterações histopatológicas no fígado dos peixes em estudo foi avaliada semi-quantitativamente pelo grau de alteração tecidual (Índice de Alterações Histopatológicas - IAH), sendo baseado na severidade das lesões. Para calcular o IAH (Modificado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic 1994), as alterações encontradas em cada órgão foram classificadas em estágios crescentes de danos nos tecidos, sendo I = alterações leves, II = alterações moderadas e III – alterações severas (Tabela I).

Tabela I. Classificação da intensidade das alterações histopatológicas observadas no fígado de *Tilapia rendalli*. Modificado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

Estágio	Alteração
I	Centro Melano Macrofágico
	Citoplasma Vacuolado
	Forma Irregular dos Hepatócitos
	Grânulos Eosinófilos no Citoplasma
	Hipertrofia Nuclear
	Hipertrofia Celular
	Núcleos Irregulares
	Núcleo em Posição Lateral
II	Infiltração de Leucócitos
	Degeneração do citoplasma
	Degeneração do núcleo
	Núcleo Picnótico
	Vacuolização Nuclear
III	Retilização dos vasos
	Retilização do Parênquima
	Necrose Focal
	Tumor

Para cada indivíduo foi calculado um valor de IAH e posteriormente a média de cada ponto amostrado. Este cálculo foi feito com base na seguinte fórmula: $IAH = (1X SI) + (10X SII) + (100X SIII)$, onde S corresponde a soma da quantidade de alterações de um determinado estágio e os algarismos I, II e III representam ao número de estágios de alterações 1, 2 e 3, respectivamente. Os valores do IAH indicam as condições em que se encontra o tecido (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994) (Tabela II). Baseado na capacidade de recuperação do tecido, as alterações foram classificadas em três estágios: I = a recuperação da estrutura e função do tecido

é possível, II = está ocorrendo efeitos severos sobre a funcionalidade do tecido e III = a recuperação do tecido é impossível. Alguns casos foram selecionados e fotografados através de um fotomicroscópio.

Tabela II: Descrição da situação do órgão, baseado nos valores do IAH (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic 1994).

VALORES DO IAH	DESCRIÇÃO
0 e 10	Funcionamento normal do órgão
11 e 20	Leves danos ao órgão
21 e 50	Mudanças moderadas no órgão
50 e 100	Lesões severas ao órgão
Acima de 100	Lesões irreparáveis ao órgão

Análise ultraestrutural

Exemplares de *Tilapia rendalli* selecionados para análise de ultraestrutura foram dissecados, ainda em campo, onde foram retirados fragmentos do fígado e em seguida fixados em glutaraldeído 2%. No laboratório os tecidos foram lavados em uma seqüência de três vezes, com tampão Cacodilato de Sódio e subseqüentemente foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. Os tecidos foram novamente lavados com tampão Cacodilato de Sódio, desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina Epon. Posteriormente foram seccionados na ultramicrotomia com cortes ultrafinos de 70 nm, em seguida foram contrastados com acetato de uranila 0,5% e observados com o auxílio do Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).

As alterações ultraestruturais observadas nas células do fígado foram descritas e posteriormente o estado de saúde do órgão foi classificado semi-quantitativamente de acordo com a severidade das alterações encontradas. Essa caracterização foi feita com base em escores de 1 a 3, sendo: 1 = controle, 2 = leves mudanças e/ou respostas visíveis e 3 = respostas severas e/ou destruição visível do órgão (Gernhöfer et al. 2001).

Análise Estatística

A fim de verificar se houve diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros físico-químicos e os pontos amostrados foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, com o auxílio do programa OriginPro 8. Uma análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada com os dados físico-químicos da água a fim de verificar quais os parâmetros estavam mais influenciando na qualidade do rio Cachoeira. Esta análise foi realizada com o auxílio do software Past 1.11, onde os dados foram transformados em logaritmos e posteriormente foi rodada a PCA com base na matriz de correlação.

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de intensidade de alterações, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes com $p < 0,05$. As diferenças entre os pontos, para cada parâmetro, foram testadas também através de uma ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis). O grau de significância foi de 95%. Essas análises estatísticas foram feitas nos softwares Past 1.11 e OriginPro 8.

Resultados

Análise físico-química

O pH e oxigênio dissolvido (OD) estavam dentro dos limites estabelecidos pela resolução 357 de 2005 do CONAMA em todos os pontos de coleta e as variáveis turbidez e condutividade elétrica se mostraram com valores elevados. A temperatura se manteve constante entre os pontos amostrados (Tabela III).

O amônio e o potássio apresentaram variação entre os pontos 2 ($5,1 \pm 4,16$ e $58,2 \pm 60,8$ respectivamente) e 5 ($211,7 \pm 269,2$ e $199,7 \pm 173,2$ respectivamente), o nitrato diferiu entre os pontos 1 ($4,9 \pm 4,5$) e 6 ($125,6 \pm 108,9$) e o sulfato variou entre os pontos 1 ($553,2 \pm 289,1$) e 3 ($183,9 \pm 11,3$), demonstrando uma grande variação entre os pontos amostrados. Estatisticamente houve diferença significativa entre alguns pontos para os parâmetros Oxigênio Dissolvido, nitrato, fosfato e sulfato. Os demais parâmetros físico-químicos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os pontos (Tabela III).

Tabela III. Análise dos parâmetros físico-químicos da água coletada nos seis pontos amostrados no rio Cachoeira. * Média e Desvio Padrão; ** Variação dos componentes (máxima e mínima) e # Parâmetros que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os pontos.

PARÂMETROS	PONTOS						#
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
pH	6,86 ± 0,99 *	6,87 ± 1,4 *	7,0 ± 1,1 *	6,65 ± 1,1 *	7,13±0,3 *	7,26 ± 0,2 *	
O.D. (mgO ₂ .L ⁻¹)	8,03 ± 1,49 * #	5,46 ± 1,2 *	5,98 ± 0,8 *	4,21 ± 0,8 * #	4,44 ± 1,7 * #	7,14 ± 0,5 * #	P1 e P6 ≠ P4 e P5
Temperatura (°C)	28,2 ± 1,97 *	28,5 ± 2,4 *	28,4 ± 1,5 *	29,1 ± 2,7 *	29,5 ± 1,2 *	29,8 ± 1,1 *	
Condutividade (µs.cm ⁻¹)	496,5 ± 1,27 *	464 ± 164,9 *	338,3 ± 25,9 *	441,6 ± 41,2 *	456,6 ± 28,1 *	453 ± 87, *	
Turbidez	169 ± 31,1 *	153 ± 195,1 *	159,5 ± 12,0 *	209 ± 26,8 *	205,5 ± 9,1 *	214 ± 52,3 *	
Sódio (µM.L ⁻¹)	2188,0 ± 775,2 [†] 1144,9 a 3304,3**	1696,0±670,4 [†] 599,1 a 2,694**	1731,9 ± 549,6 [†] 981,1 a 2,377,9**	2138,5 ± 907,0 [†] 796,1 a 3,161,6**	1758,2 ± 934,4 [†] 541,6 a 3,097,4**	2202,1 ± 819,5 [†] 1475,1 a 3889,0**	
Amônio (µM.L ⁻¹)	96,8 ± 184,2 [†] 1,90 a 465,1**	5,1 ± 4,16 [†] 0,2 a 8,3**	7,5 ± 3,8 [†] 2,2 a 12,2**	166,0 ± 180,5 [†] -4,1 a 354,6**	211,7 ± 269,2 [†] 3,9 a 750,0**	22,3 ± 4,0 [†] 0,2 a 103,5**	
Potássio (µM.L ⁻¹)	77,5 ± 54,1 [†] 5,3 a 138,9**	58,2 ± 60,8 [†] 6,0 a 133,5**	92,3 ± 3,1 [†] 45,7 a 125,6**	135,1 ± 77,3 [†] 30,9 a 233,3**	199,7 ± 173,2 [†] 22,2 a 552,3**	119,0 ± 76,1 [†] 37,1 a 231,1**	
Magnésio (µM.L ⁻¹)	681,5 ± 280,1 [†] 370,2 a 1,125,8**	556,7 ± 212,9 [†] 255,0 a 859,3**	577,1 ± 156,2 [†] 349,4 a 723,9**	524,6 ± 156,5 [†] 284,7 a 674,5**	500,5 ± 158,3 [†] 216,6 a 668,8**	506,0 ± 147,3 [†] 340,0 a 768,0**	
Cálcio (µM.L ⁻¹)	457,0 ± 2,07 [†] 258,0 a 772,1**	363,0 ± 1,35 [†] 192,0 ± 546,4**	362,5 ± 1,1 [†] 247,2 a 524,5**	391,6 ± 179,8 [†] 218,4 a 669,7**	449,6 ± 2,0 [†] 201, 4 a 711,3**	437,2 ± 135,5 [†] 271,9 a 643,6**	
Cloro (µM.L ⁻¹)	3343,2 ± 2124,8* 461,5 a 6,658,6**	2081,0 ± 1707,8 [†] 250,1 a 5,466,5**	1724,7 ± 1400,2 [†] 112,6 a 4,164,4**	2265,9 ± 2088,2 [†] 239,6 a 6,371,5**	2134,9 ± 1638,2 [†] 397,5 a 4,776,3**	1949,8 ± 1240,1 [†] 683,9 a 4,242,7**	
Nitrato (µM.L ⁻¹)	4,9 ± 4,5 [†] 0,6 a 12,3**	10,4 ± 9,3 [†] 0,9 a 10,9**	6,4 ± 8,1 [†] 0,4 a 19,7**	15,0 ± 17,8 [†] 0,5 a 42,0**	107,9 ± 59,4 [†] 60,6 a 222,1**	125,6 ± 108,9 [†] 21,0 a 336,2**	P1; P2; P3 e P4 ≠ P5 e P6
Fosfato (µM.L ⁻¹)	6,9 ± 576,7 [†] 1,4 a 16,2**	5,2 ± 4,2 [†] 1,7 a 12,6**	6,5 ± 4,8 [†] 0,6 a 12,8**	20,7 ± 15,5 [†] 3,1 a 50,1**	28,1 ± 16,3 [†] 8,9 a 50,6**	15,7 ± 9,3 [†] 7,0 a 29,4**	P1; P2 e P3≠ P4; P5 e P6
Sulfato (µM.L ⁻¹)	553,2 ± 289,1 [†] 222,8 a 1,071,0**	233,7 ± 117,4 [†] 121,4 a 393,5**	183,9 ± 11,3 [†] 48,1 a 312,8**	227,8 ± 126,6 [†] 88,2 a 300,6**	235,6 ± 83,0 [†] 99,4 a 344,6**	185,1 ± 110,0 [†] 71,6 a 352,7**	P1 ≠ P2; P3; P4; P5 e P6

As médias e a concentração dos componentes químicos analisados apresentaram uma variação entre os pontos coletados (Tabela III), sendo que a Análise de Componentes Principais (PCA) demonstrou que as variações entre os pontos amostrados e os parâmetros analisados foram explicadas em dois eixos significativos com uma variância total de 44,07% (eixo 1) e 26,39% (eixo 2). Entre esses dois eixos, o 1 é o que melhor explica a influência das variáveis físico-químicas nos seis locais de amostragem (Fig. 2).

A análise demonstrou que o eixo 1 estava diretamente correlacionado com os parâmetros, pH, temperatura, NO_3^- (nitrato), potássio (K^+), fosfato (PO_4^{3-}) e turbidez, e inversamente correlacionado com os elementos magnésio (Mg^{2+}), oxigênio dissolvido (OD) e os dados biológicos obtidos pelo IAH. Já o eixo 2 foi correlacionado com os parâmetros condutividade, nitrato (NO_3^-), cálcio (Ca^{2+}), amônio (NH_4^+), sulfato (SO_4^{2-}) e cloro (Cl^-). Os resultados da análise de Componentes Principais (PCA) mostrou que todos os parâmetros estudados estão influenciando na qualidade da água dos pontos de amostragem analisados (Fig. 2). Este fato indica que, provavelmente, além das substâncias das substâncias analisadas, outras substâncias que não foram detectadas pelo método de análise devem estar atuando sobre os organismos destes locais.

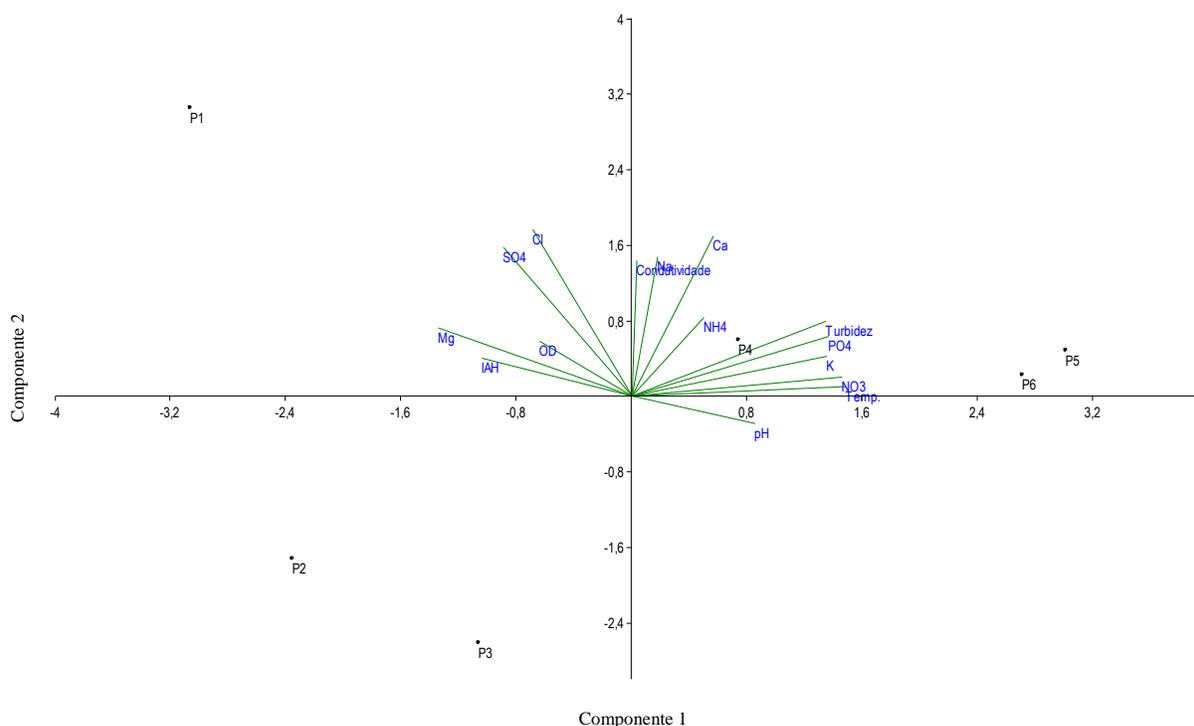


Fig.2. Análise do Componente Principal (PCA) dos parâmetros físico-químicos amostrados no rio Cachoeira.

Análise histopatológica

Para análise histológica, foram utilizados 53 exemplares de *Tilapia rendalli*, sendo dez indivíduos de cada ponto, com exceção dos pontos dois e seis, onde foram coletados somente oito e cinco indivíduos respectivamente. O peso total variou de 0,3 a 5,21 g, com um peso médio de 1,68g e o comprimento padrão variou de 14,4 a 54,48 mm, com tamanho médio de 32,1 mm, indicando que os indivíduos eram juvenis.

O fígado apresentou o mesmo padrão estrutural dos demais Teleósteos. Os hepatócitos possuíam um formato poliédrico, os núcleos eram na sua maioria esféricos, grandes e localizados no centro da célula. O nucléolo era evidente e o citoplasma apresentava granulações. As células estavam distribuídas no parênquima hepático de forma irregular, estando estas separadas por capilares sinusóides. Foi observado também a presença de vasos sanguíneos menores, ductos biliares e pâncreas exócrino, sendo este último constituído por células ácino serosas, que na parte apical apresentavam uma coloração eosinófila e junto à base, basófila (Fig.3. A).

Todos os indivíduos apresentaram alterações histopatológicas, sendo que as principais lesões observadas foram: alterações no pâncreas exócrino, retilinização dos vasos sanguíneos, núcleo picnótico, degeneração do citoplasma, hepatócitos e núcleos irregulares, núcleo em posição lateral, vacuolização do citoplasma, infiltração de leucócitos, hipertrofia nuclear e celular e necrose focal. Essas alterações observadas estiveram distribuídas em todos os estágios de classificação (I, II e III), de acordo a severidades das lesões (Tabela I).

No ponto 1 (Estiva) foram observadas alterações como retilinização dos vasos sanguíneos (Fig. 3. B), núcleo em posição lateral e hepatócitos irregulares em todos os exemplares. Degeneração do citoplasma e modificação no pâncreas exócrino também foram alterações bastante frequentes (Tabela IV). Além destas alterações, foi observada a presença de células gigantes de corpo estranho em alguns indivíduos, vasos sanguíneos, arteríolas dilatadas, agregação de células, pequenos fibromas e parasitos não identificados (Fig. 3.D).

No ponto 2 (Vila de Itapé), foi verificado que todos os exemplares apresentavam o citoplasma degenerado e vacuolado e os vasos sanguíneos retilinizados (Fig. 3. C). Foi observado um percentual elevado de indivíduos com núcleo em posição lateral (87,5%) e hepatócitos irregulares (87,5%) (Tabela IV). A presença de hepatócitos agrupados, fibroblastos, células gigante de corpo estranho e vasos sanguíneos dilatados foram observados em alguns exemplares.

No ponto 3 (Ferradas) todos os exemplares analisados apresentaram fígados com o citoplasma vacuolado (Fig. 4. A), o núcleo em posição lateral e os vasos sanguíneos retilíneos. A forma irregular dos hepatócitos e a degeneração do citoplasma (Fig. 4. B) também foi bastante visualizada. Todos os indivíduos do ponto 4 (Jardim das Acácias) apresentaram vasos retilinizados, citoplasma vacuolado e degenerado, núcleo picnótico e em posição lateral e hepatócitos irregulares (Tabela IV). Foi verificado em indivíduos destes dois pontos acentuada presença de leucócitos, dilatação dos vasos sanguíneos, agrupamento de hepatócitos e células gigante de corpo estranho.

Tabela IV. Frequência dos diferentes tipos de alterações histopatológicas por ponto de amostragem. N – Número amostral; F – Frequência.

ALTERAÇÕES	PONTOS					
	1	2	3	4	5	6
	N					
	10	8	10	10	10	5
	F (%)					
Retilização dos vasos sanguíneos	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Degeneração do citoplasma	90%	100%	80%	100%	100%	100%
Núcleo em posição lateral	100%	87,5%	100%	100%	100%	100%
Citoplasma Vacuolado	80%	100%	100%	100%	40%	100%
Núcleo picnótico	70%	62,5%	50%	100%	40%	60%
Hepatócitos irregulares	100%	87,5%	90%	100%	10%	100%
Núcleo irregular	60%	50%	30%	40%	50%	40%
Hipertrofia nuclear	70%	62,5%	50%	40%	40%	80%
Pâncreas alterado	90%	75%	50%	80%	90%	40%
Degeneração nuclear	30%	12,5%	30%	30%	20%	40%
Hipertrofia celular	20%	50%	30%	60%	50%	40%
Infiltração de leucócitos	20%	12,5%	10%	0%	0%	0%
Necrose focal	20%	25%	10%	20%	10%	0%
Núcleo vacuolado	10%	12,5%	50%	20%	10%	40%
Centro Melano Macrofágico	10%	37,5%	0%	0%	0%	20%

Foi observado que o fígado de todos os exemplares dos pontos 5 (Pitu) e 6 (Banco da Vitória) apresentavam retilinização dos vasos, degeneração do citoplasma e o núcleo em posição lateral. Todos os indivíduos do ponto 6, Banco da Vitória, apresentaram também o citoplasma vacuolado (Tabela IV). Alguns indivíduos destes pontos apresentaram processos inflamatórios com células sanguíneas do sistema imunológico (principalmente linfócitos), hepatócitos agrupados e vasos sanguíneos bastantes dilatados. De modo geral, as alterações mais frequentes

foram retilinização do parênquima e dos vasos sanguíneos, presente em 100% dos exemplares analisados, irregularidade na forma dos hepatócitos (79,2%), núcleo em posição lateral (98,1%), vacuolização do citoplasma (84,9%) e degeneração do citoplasma (75,5%).

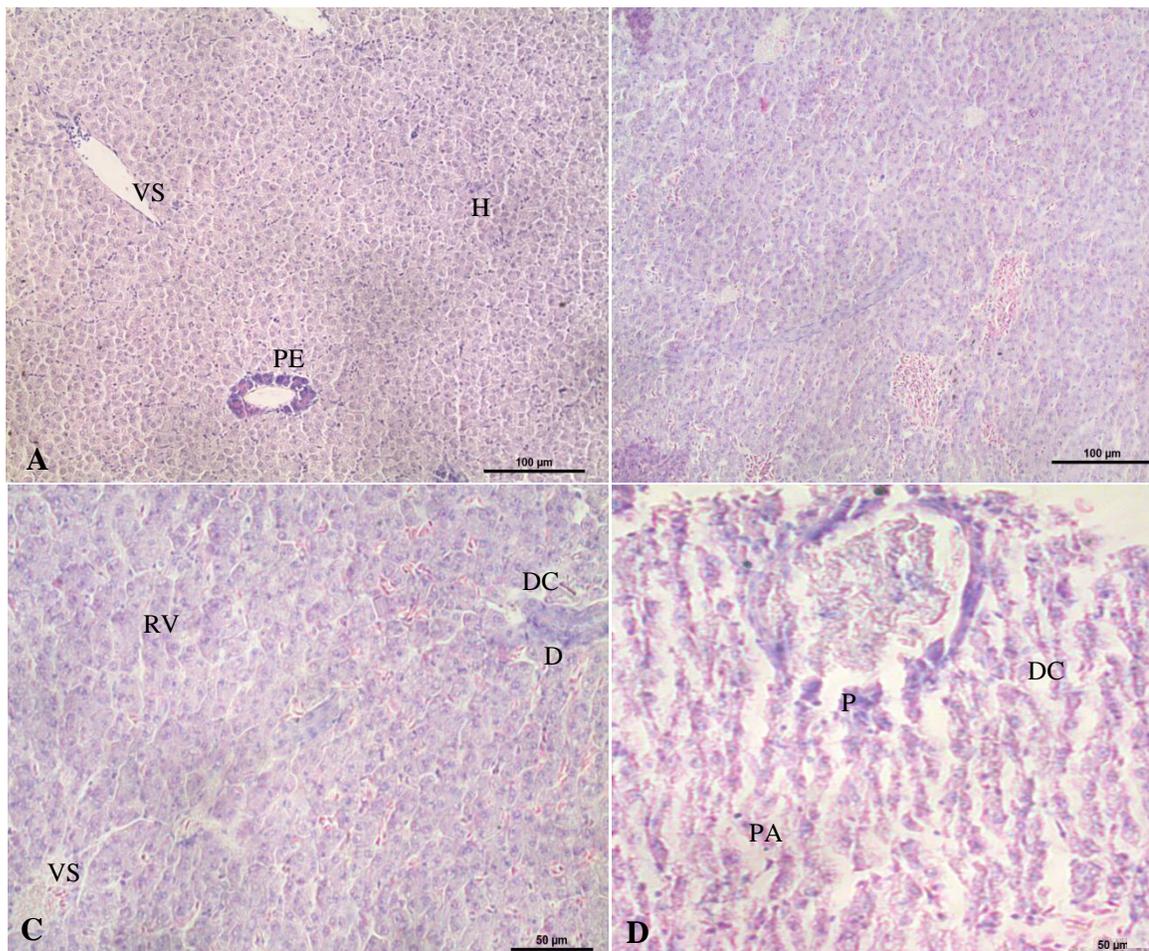


Fig.3. A - Fígado próximo do normal de *Tilapia rendalli*, H&E. B - Fígado com alterações leves, H&E. C - Fígado com alterações moderadas, H&E. D - Fígado com alterações severas, H&E. PE - Pâncreas exócrino, H - Hepatócitos, VS - Vasos Sanguíneos, RV - Retilinização dos vasos sanguíneos, D - Ducto biliar, DC - Degeneração Celular, PA - Parênquima alterado, P - Parasito.

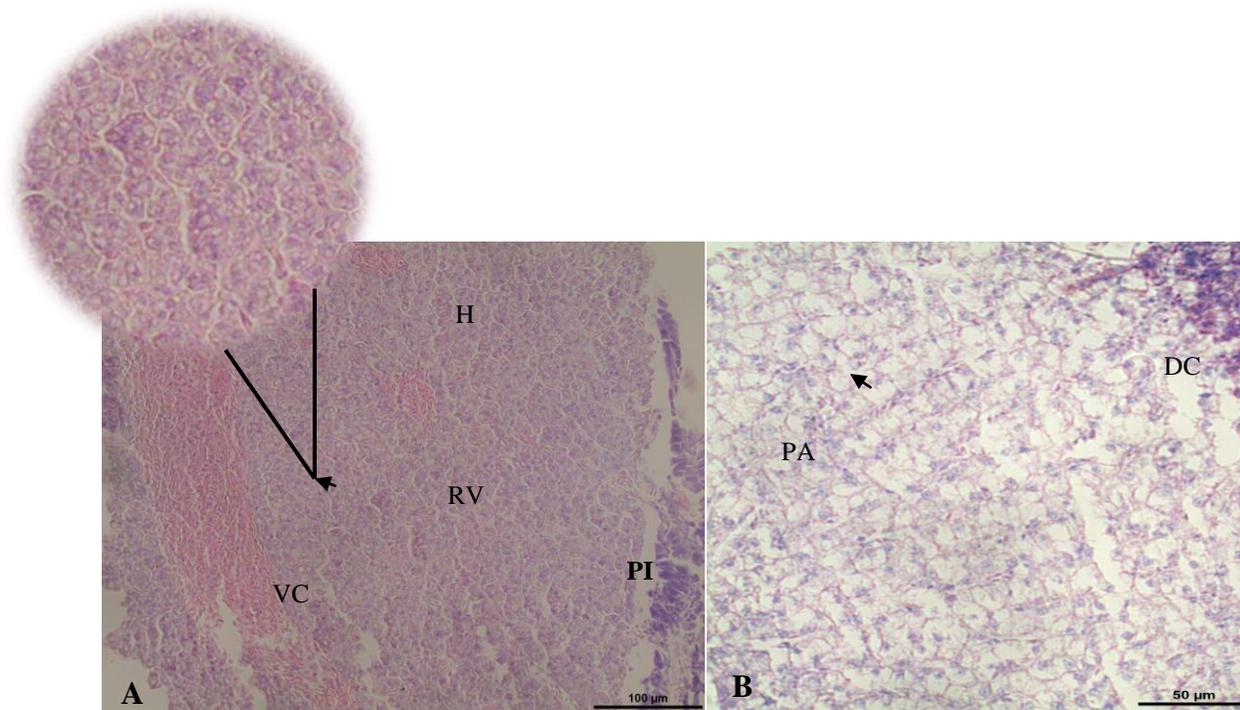


Fig. 4. A – Fígado com alterações moderadas, H&E. B – Fígado com alterações severas, H&E. H – Hepatócitos, RV – Retilização dos vasos sanguíneos, VC – Vaso congestionado, PI – Pâncreas exócrino irregular, PA – Parênquima hepático alterado, DC – Degeneração celular e, no detalhe, Células vacuoladas (seta).

A análise da frequência de intensidade das alterações histopatológicas demonstrou que no ponto 1 (Estiva), 60% das alterações observadas nos indivíduos foram classificadas como moderadas (2) e as alterações leves (1) e severas (3) obtiveram 20% cada uma. O ponto 2 (Vila de Itapé) também apresentou uma média elevada de alterações moderadas (62,5%), seguido de alterações leves e severas (25% e 12,5%, respectivamente). Foi observado nos pontos 3 (Ferradas), 4 (Jardim das Acácias), 5 (Pitu) e 6 (Banco da Vitória) um predomínio de alterações moderadas (80%, 80%, 70% e 100%, respectivamente), com destaque ao ponto 6 em que todas as alterações observadas foram descritas como moderadas. (Fig.5).

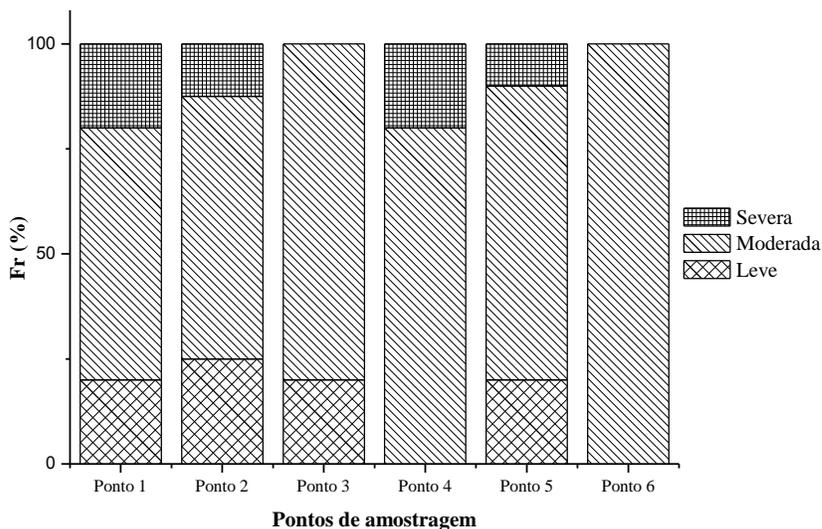


Fig.5. Frequência de intensidade das alterações histopatológicas observadas no fígado de *Tilapia rendalli* por ponto de amostragem no rio Cachoeira.

Em relação à análise do IAH, os pontos 4 (Jardim das Acácias), 2 (Vila de Itapé), 1 (Estiva) e 3 (Ferradas) apresentaram as médias mais elevadas ($67,3 \pm 43,5$; $66,25 \pm 47,5$; $63,5 \pm 47,1$ e $50,1 \pm 37,4$ respectivamente), sendo que o resultado do IAH para estes pontos indica que os exemplares apresentavam alterações severas no órgão. As médias do IAH dos pontos 5 (Pitu) e 6 (Banco da Vitória) foram mais baixas ($49,8 \pm 33,5$ e $41,2 \pm 5,8$ respectivamente), quando comparadas com as demais (Fig. 6). Entretanto, esses valores demonstram a presença de alterações moderadas no órgão.

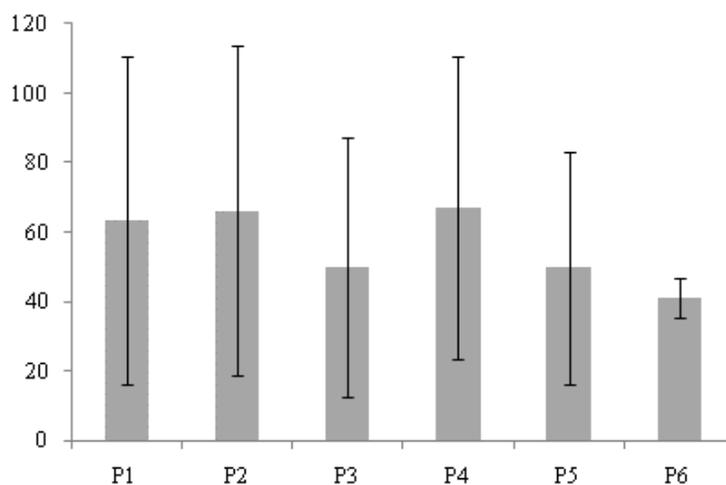


Fig.6. Médias e Desvio Padrão do Índice de Alteração Histopatológica (IAH) no fígado de *Tilapia rendalli* nos pontos amostrados no rio Cachoeira.

A elevada frequência de alterações moderadas e as médias elevadas do IAH indicaram que os indivíduos de todos os seis pontos analisados estavam sofrendo a ação de algum agente estressor, mas que se as condições do ambiente melhorassem, os órgãos seriam capazes de apresentarem recuperação. Os resultados das análises estatísticas demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos pontos amostrados, tanto para a frequência de intensidade quanto para as médias do IAH.

Análise de Ultraestrutura

Para a análise ultraestrutural foram utilizados um total de 8 fígados de *Tilapia rendalli*. Esta análise demonstrou que as células apresentavam o mesmo padrão estrutural, sendo formadas por núcleos, citoplasma e organelas, dentre as quais puderam ser visualizadas mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de golgi. Os hepatócitos apresentaram núcleos arredondados, sendo este composto por cromatina granular e condensada, localizada na periferia do núcleo. Foi observado a presença de células sanguíneas, glicogênio espalhados pelo citoplasma e grânulos de zimogênio junto aos hepatócitos dos indivíduos analisados (Fig. 7. A).

Em todos os pontos analisados, foram verificadas alterações na organização ultraestrutural das células, indicando que os mesmos estão sendo expostos a algum agente estressor presente na água, sendo que as principais alterações observadas foram gotículas de lipídios (Fig. 7. B), grânulos de secreção (Fig. 7. C), necrose celular (Fig. 7. D), núcleo em processo de apoptose, organelas com arquitetura não definida, grânulos de zimogênio com tamanhos elevados e compostos por um material bastante eletrondenso (Fig. 8. A) e mitocôndria com tamanhos e formas variadas (Fig. 8. B). Outras alterações observadas foram: proliferação e degeneração mitocondrial, excesso de heterocromatina condensada na periferia do núcleo e modificação estrutural no retículo endoplasmático rugoso.

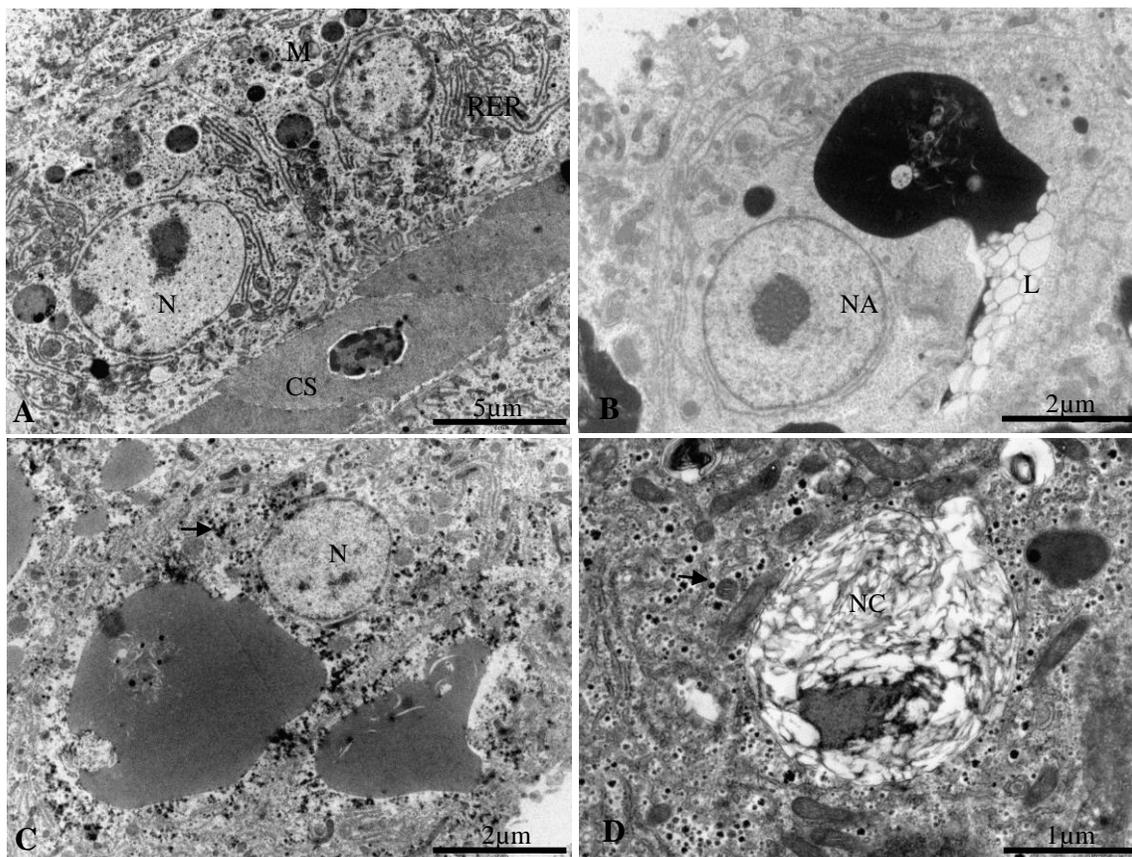


Fig.7. Microscopia eletrônica do fígado de *Tilapia rendalli*. N – Núcleo, CS – Célula sanguínea, M – Mitocôndria, RER – Retículo Endoplasmático Rugoso, NA – Núcleo apoptótico, L – Lipídios, NC – Necrose celular e Glicogênio (seta).

De acordo com a análise semi-quantitativa realizada através da severidade das alterações, não foi possível caracterizar nenhum dos pontos amostrados como no estágio de controle ou normal. Os pontos 5 (Pitu) e 6 (Banco da Vitória) foram classificados como moderados, ou seja, foi perceptível a presença de leves mudanças, podendo ser visualizado células em processo de degeneração. Os pontos 1 (Estiva), 2 (Vila de Itapé), 3 (Ferradas) e 4 (Jardim das Acácias) foram classificados como severos, em função do fato de ter sido observada uma grande quantidade de grânulos de secreção com tamanho elevado, que em alguns, casos apresentavam um tamanho maior que o núcleo. Também foram observadas células em processo de necrose e/ou apoptose, indicando uma destruição do órgão (Fig. 8. C e D).

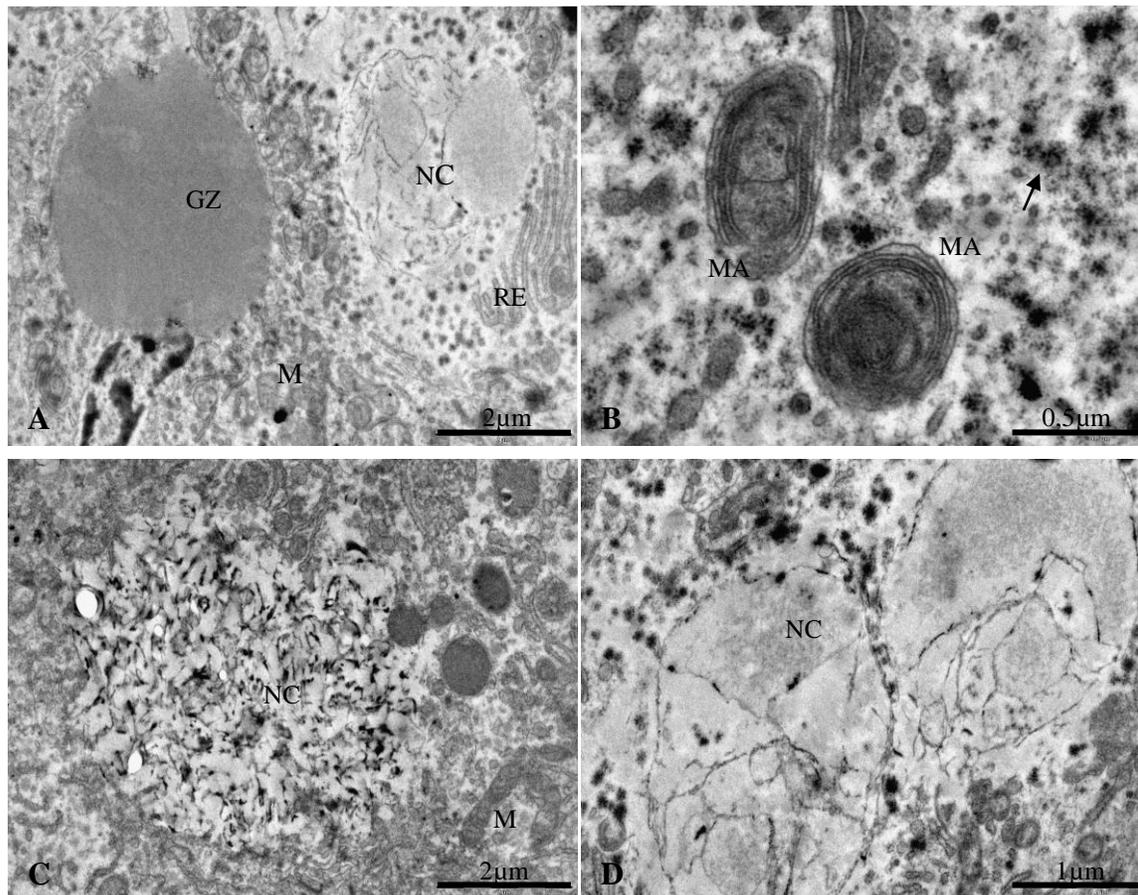


Fig.8. Microscopia eletrônica do fígado de *Tilapia rendalli*. GZ – Grânulo de Zimogênio com tamanho elevado, M – Mitocôndria, NC – Necrose celular, RER – Retículo endoplasmático rugoso, MA – Mitocôndria com forma alterada e Glicogênio (seta).

Discussão

O diagnóstico da integridade dos ecossistemas e a quantificação do grau de deterioração, juntamente com suas conseqüências sobre o ecossistema, tem sido um desafio permanente para os estudiosos da área ambiental (Bruschi Jr. et al. 2000). Neste sentido, o estudo realizado utilizando metodologias como a análise histopatológica, de ultraestrutura e análise de componentes principais com os parâmetros físicos e químicos da água se mostrou eficiente.

O fígado de *Tilapia rendalli* demonstrou ser vulnerável as modificações na qualidade do ambiente aquático em função de terem sido observadas alterações histopatológicas e ultraestruturais, que se constituem num biomarcador de que os peixes do rio Cachoeira estão

sofrendo a ação de algum agente estressor. As alterações cito-histopatológicas observadas demonstraram que o mesmo é um excelente órgão-alvo e autores como Au (2004) e Abdel-Moneim et al. (2012) salientaram que isto se deve ao fato deste órgão fornecer respostas satisfatórias quando em contato com alguma substância química e por exercer funções vitais para a sobrevivência dos peixes (Au et al. 1999; Paris-Palacios et al. 2000; Perendija et al. (2011). Authman (2011) verificou alterações semelhantes em peixes expostos a algum composto químico.

A ocorrência das alterações histopatológicas e ultraestruturais observadas, provavelmente, foi muito influenciada pela presença de diversos compostos químicos presentes na água do rio Cachoeira. Em todos os pontos amostrados foi possível observar a presença de um ou mais nutrientes na água em elevadas concentrações, como sódio, potássio, magnésio, cloreto, fosfato e sulfato, sendo essa acentuada quantidade da carga de nutrientes prejudiciais para qualidade do rio e conseqüentemente para a biota deste ambiente. Estudos anteriores realizados neste rio apontaram a ocorrência de metais pesados em toda sua extensão (Klumpp et al. 2002; Pinho 2001), o que pode justificar a ocorrência de lesões no fígado dos peixes analisados, uma vez que todos os indivíduos amostrados apresentaram alterações cito-histopatológicas.

As alterações histopatológicas mais frequentes observadas em *Tilapia rendalli* foram retilinização dos vasos sanguíneos, degeneração do citoplasma, núcleo em posição lateral e vacuolização do citoplasma, sendo que a ocorrência deste tipo de alterações são normalmente associadas a peixes expostos a elevadas concentrações de metais pesados como cobre (Figueiredo-Fernandes et al.2007), alumínio (Authman, 2011), cádmio e zinco (Van Dyc et al. 2005) e herbicidas (Peebua et al. 2008). Authman (2011) salientou que a presença de vacúolos são um indicativo de que os peixes estão expostos a alguma substância tóxica e que estas estruturas modificam o parênquima hepático, dando ao fígado uma aparência irregular (Kohler et al. 1992).

A ocorrência de uma elevada freqüência de vacúolos nos hepatócitos permitiu inferir que há relação entre a ocorrência destas lesões e a qualidade do ambiente, fazendo com que estes resultados possam ser considerados bons biomarcadores ambientais. A observação de uma elevada freqüência destas vesículas, com formato irregular, em nível de ultraestrutura, se constitui em uma resposta biomarcadora importante, uma vez que fornecem informação preditiva, antecipando a ocorrência de alterações ao nível tecidual. Stehr et al. (1998) descreveram que a

presença de gotículas de lipídios contidas dentro de vacúolos em hepatócitos de peixes, observadas tanto na microscopia de luz quanto na eletrônica, estão associadas a presença de algum contaminante.

Alterações no núcleo dos hepatócitos e no tamanho do mesmo foram observadas em indivíduos de todos os pontos amostrados, podendo estar associados à presença de poluentes no ambiente. Alterações semelhantes foram observadas por Figueiredo-Fernandes et al. (2007), sendo que Peebua et al. (2007) observaram a presença de núcleos picnóticos em hepatócitos de *Oreochromis niloticus* expostos a concentrações agudas e subcrônicas de herbicidas e Marigómez et al. (2006) salientaram que a ocorrência de núcleo picnótico em hepatócitos de peixes é uma evidência de que o órgão está em processo degenerativo, o que pode ser causado pela exposição do mesmo a altas concentrações subletais de substâncias químicas.

Com a exceção dos pontos três e seis, nos demais pontos foi observada a presença de indivíduos com células hepáticas com necrose, que é considerada uma alteração severa. Para Camargo e Martinez (2007), a necrose focal é uma alteração grave cujos danos causados no tecido são irreparáveis. Kohler et al. (1992) também classificaram essa alteração como severa, associando a existência desta lesão a presença de alguma substância tóxica. A elevada quantidade de íons observada nas amostras do rio Cachoeira permitiu inferir que a presença de hepatócitos necrosados nos exemplares analisados está diretamente relacionada com a qualidade físico-química da água deste ambiente.

Alterações ultraestruturais na forma e no tamanho das mitocôndrias foram observadas com uma frequência elevada nos indivíduos analisados, sendo que a existência de degeneração mitocondrial em fígado de peixes pode ser considerada como um indicio de que os mesmos estão sofrendo a ação de algum estressor (Abdel-Moneim e Abdel-Mohsen, 2010). Autores como Au et al. (1999) e Paris-Palacios et al. (2000) também verificaram que peixes expostos a elevadas concentrações de metais pesados ou nutrientes apresentavam mitocôndrias alteradas nas células do fígado.

A presença de nutrientes e metais pesados na água do rio, associado à ocorrência de alterações patológicas e ultraestruturais severas, são um indicativo de que os indivíduos estão sujeitos a um ambiente de baixa qualidade. Flores-Lopes e Malabarba (2007) salientaram que a prevalência de alterações patológicas no fígado de peixes pode ser diretamente proporcional ao grau de contaminação do ambiente por metais pesados e pesticidas. Lesões ultraestruturais foram

observadas em fígados de peixes expostos a substâncias químicas ou a alguma condição ambiental desfavorável (Au et al. 1999; Paris-Palacios et al. 2000; Gernhofer et al, 2001; Abdel-Moneim e Abdel-Mohsen, 2010; Perendija et al. 2011; Authman, 2011). Autores como Camargo e Martinez (2007), Paulo et al. (2012) e Abdel-Moneim et al. (2012), também observaram este tipo de alterações histopatológicas e as relacionaram a qualidade do rio amostrado.

Klumpp et al. (2002) verificaram uma elevada concentração de alumínio no rio Cachoeira, sendo que, possivelmente, a estação de tratamento de esgotos do município de Itabuna seja a principal fonte responsável pela ocorrência deste íon no rio. Além dos metais, foram verificadas elevadas concentrações de nutrientes como amônio, magnésio, fosfato, potássio e sulfato, sendo possivelmente provocada pela substituição da vegetação nativa por cultivo agrícola, criação de gado e formação geológica, além de despejo de esgotos domésticos e industriais (Lucio et al. 2012).

Os resultados obtidos permitiram inferir que os indivíduos de todos os pontos amostrados estão sofrendo a ação de agentes estressores, uma vez que, pela análise da frequência de intensidade de alterações histopatológicas foi verificada uma predominância de alterações moderadas em todos os pontos amostrados e a presença de alterações severas nos pontos 1 (Estiva), 2 (Vila de Itapé), 4 (Jardim das Acácias) e 5 (Ponto do Pitu). O ponto 2 (Vila de Itapé) foi o que apresentou uma maior frequência de exemplares com morte celular, concordando com os dados obtidos por Paulo et al. (2012), para quem este ponto é um dos classificados como de péssima qualidade no rio Cachoeira. Além disso, a ocorrência de uma elevada frequência de alterações moderadas e severas, aliada a ocorrência de uma baixa frequência de alterações leves, indica que os indivíduos que vivem neste ambiente estão sendo expostos por um longo período de tempo a ação de algum agente estressor (Abdel-Moneim et al. 2012), o que também foi verificado por Paulo et al. (2012) ao realizar estudos no rio Cachoeira.

Os resultados obtidos pelo IAH demonstraram que os pontos 1 (Estiva), 2 (Vila de Itapé) e 4 (Jardim das Acácias) apresentaram os valores mais elevados, indicando que os indivíduos analisados apresentavam lesões moderadas ou severas no órgão, corroborando os resultados da análise da frequência de intensidade das alterações. Os pontos 1 (Estiva), 2 (Vila de Itapé), 3 (Ferradas) e 4 (Jardim das Acácias) foram os que apresentaram alterações ultraestruturais mais severas, corroborando com os dados obtidos pela análise da frequência da intensidade de alterações e pelos dados do IAH. Resultados semelhantes também foram verificados para os

pontos 5 (Ponto do Pitu) e 6 (Banco da Vitória), sendo estes descritos como moderados pela análise ultraestrutural e pela análise histopatológica.

No ponto 1, a severidade das alterações histopatológicas e ultraestruturais observadas, provavelmente, está relacionada a concentração de sulfato verificada ter sido elevada, sendo este parâmetro considerado estatisticamente significativo em relação aos demais. Pereira (2004) salientou que a presença excessiva de sulfato na água pode estar associada à descarga de esgoto doméstico, a efluentes industriais e também pela formação geológica do sistema hídrico. Lucio et al. (2012) observaram neste ponto uma grande quantidade de íons, dentre estes podendo ser citados o cloreto, sulfato e magnésio.

No ponto 4 (Jardim das Acácias) foram verificados os valores mais elevados do IAH em função de só ocorrerem alterações moderadas e severas, assim como também foi observado severidade nas alterações encontradas a nível celular. Este fato pode estar associado à elevada concentração de amônio (NH_4^+) verificada neste ponto. Lucio et al. (2012) também verificaram uma elevada concentração deste íon neste mesmo local e associaram a ocorrência de uma alta concentração deste íon neste ponto ao fato de serem observadas áreas de pastagens, permitindo a entrada de afluentes agrícolas. Pinho (2001) verificou um alto teor de fosfato neste local, o que provavelmente foi causado pela presença de efluentes industriais e agrícolas, contendo detergentes.

Os pontos 5 (Ponto do Pitu) e 6 (Banco da Vitória) apresentaram baixos valores do IAH quando comparados aos demais, ainda assim se constituindo em valores que apontam alterações moderadas no órgão e que indicam que os indivíduos estão sendo expostos a algum agente estressor, o que também foi visualizado na análise ultraestrutural, uma vez que os órgãos nestes pontos foram classificados como moderados. Paulo et al. (2012) também observaram um baixo valor de IAH neste ponto ao estudar o fígado de *Poecilia vivipara*. A análise físico-química demonstrou uma maior concentração de potássio, amônio e fosfato nestes pontos, o que também foi verificado por Lucio et al. (2012). Klumpp et al. (2002) também observaram um alto teor de fosfato ao longo do rio Cachoeira. De acordo com Neto et al. (2012), uma alta concentração de fósforo em um ambiente aquático é um fator preocupante, uma vez que este íon é um dos nutrientes limitantes do processo de eutrofização.

O ponto 6 (Banco da Vitória) apresentou um alto teor de sódio e nitrato, o que permitiu inferir que este ambiente estava sendo alvo de descarga de efluentes. O predomínio de alterações

moderadas no órgão, a média do IAH caracterizada como moderada e a classificação ultraestrutural descritas como moderadas, juntamente com os dados físico-químicos, permitiram a verificação de que este ponto se encontra em processo de degradação. Pinho (2001) afirmou que este ponto era um dos que apresentava maior profundidade, permitindo com que a carga orgânica se diluísse com maior facilidade. Embora este ponto tenha apresentado a média mais baixa do IAH, ele também apresenta sinais de degradação, uma vez que o conjunto de respostas fornecidas pelas metodologias aplicadas são suficientes para inferir que este ponto está sendo impactado.

A frequência de intensidade das alterações e os valores do IAH não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os pontos, demonstrando que eles apresentam uma qualidade semelhante e que ambos estão sendo afetados pela presença de agentes estressores. Com base nos resultados obtidos por meio das metodologias utilizadas neste estudo, foi verificado que os pontos localizados entre as cidades de Itapé e Itabuna (1 – Estiva, 2 – Vila de Itapé, 3 – Ferradas e 4 – Jardim das Acácias) são os que estão com uma pior qualidade ambiental. Com relação à análise físico-química, foi verificado haver pouca variação espacial dos íons observados, o que demonstrou que ambos os pontos apresentavam uma qualidade físico-química semelhante, indicando que vários dos parâmetros estudados podem estar afetando os indivíduos que habitam estes ambientes aquáticos.

Devido a grande dinâmica dos rios e ao sinergismo dos componentes que ali ocorrem, a determinação de um provável agente causador da degradação destes ambientes não é uma tarefa fácil, uma vez que nestes ambientes ocorre a presença de uma variedade de agentes estressores, como metais pesados, herbicidas, agrotóxicos, nutrientes, matéria orgânica e resíduos sólidos de origem doméstica, agrícola e industrial.

Conclusões

Os dados físico-químicos, histopatológicos e ultraestruturais apontam que o rio Cachoeira está sofrendo um processo de degradação em função da presença de agentes estressores, o que tem afetado diretamente a saúde dos organismos que ali vivem. Esta observação é corroborada pela ocorrência de alterações histo-citológicas e elevada frequência de lesões moderadas e severas.

A junção da utilização de ferramentas convencionais com os biomarcadores histopatológicos e de ultraestrutura demonstrou ser um excelente método de avaliação ambiental, fornecendo respostas mais consistentes acerca da qualidade ambiental do rio Cachoeira.

Referências

- Abdel-Moneim, A. M. & Abdel-Mohsen, H. A. (2010). Ultrastructure changes in hepatocytes of catfish *Clarias gariepinus* from Lake Mariut, Egypt. *Journal of Environmental Biology*, 31(5), 715–720.
- Abdel-Moneim, A. M., Al-Kahtani, M. A. & Elmenshawy, O. M. (2012). Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88(8), 1028–1035.
- Arias, A. R. L., Buss, D. F., Albuquerque, C. de, Inácio, A. F., Freire, M. M., Egler, M., Mugnai, R. & Baptista, D. F. (2007). Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva*, 12(1), 61–72.
- Au, D. W. T., Wu, R. S. S., Zhou, B. S. & Lam, P. K. S. (1999). Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo[a]pyrene. *Environmental Pollution*, 104(2), 235–247.
- Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9–10), 817–834.
- Authman, M. M. N. (2011). Environmental and experimental studies of aluminium toxicity on the liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fish. *Life Science Journal*, 8(4), 764–776.
- Bruschi Jr., W., Malabarba, L. R. & Silva, J. F. P. da. (2000). Avaliação da Qualidade Ambiental dos riachos através das Taxocenoses de peixes. In: Centro de Ecologia/UFRGS. *Carvão e Meio Ambiente*. Porto Alegre, Ed. da Universidade/UFRGS, 803–809.
- Camargo, M. M. P. & Martinez, C. B. R. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327–336.
- Cetra, M., Ferreira, F. C. & Carmassi, A. L. (2009). Caracterização das assembléias de peixes de riachos de cabeceira no período chuvoso na bacia do rio Cachoeira (SE da Bahia, NE do Brasil). *Biota Neotropica*, 9(2), 107–116.

- Figueiredo-Fernades, 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(3), 103–109.
- Flores-Lopes, F. & Malabarba, L. R. (2007). Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. *Biociências*, 15(2), 166–172.
- Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E. & Triebkorn, R. (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8, 241–260.
- Goulart, M. D. C. & Callisto, M. (2003). Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, 2(1), 78–85.
- Hauser-Davis, R. A., Oliveira, T. F., Silbeira, A. M., Silva, T. B. & Ziolli, R. L. (2010). Case study: Comparing the use of nonlinear discriminating analysis and Artificial Neural Networks in the classification of three fish species: acarás (*Geophagus brasiliensis*), tilapias (*Tilapia rendalli*) and mullets (*Mugil liza*). *Ecological Informatics*, 5(6), 474–478.
- Jenkins, J.A. (2004). Fish bioindicators of ecosystem condition at the Calcasieu Estuary, Louisiana. *USGS Open-File Report*, 2004–1323, 47.
- Jesus, T. B. & Carvalho, C. E. V. (2008). Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, 12(4), 680–693.
- Karr, J. R. (1981). Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, 6(6), 21–27.
- Klumpp, A., Bauer, K., Franz-Gerstein, C. & Menezes, M. (2002). Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the rio Cachoeira in Bahia (Brazil). *Environment International*, 28(3), 165–171.
- Kohler, A., Deisemann, H. & Lauritzen, B. (1992). Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. *Marine Ecology Progress Series*, 91(1–3), 141–153.
- Lins, J. A. P. N., Kirschnik, P. G., Queiroz, V. S. & Cirio, S. M. (2010). Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica Ciências. Agrárias e Ambientais*, 8 (4), 469–484.

- Lucio, M. Z. T. P. Q. L., Santos, S. S. & Silva, D. M. L. (2012). Hydrochemistry of Cachoeira River (Bahia State, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 24(2), 181–192.
- Malabarba, L. R. & Reis, R. E. (1987). Manual de Técnicas para a preparação de Coleções Zoológicas. Campinas: *Sociedade Brasileira de Zoologia*. Peixes: 36, 1–14.
- Marigómez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L. & Cajaraville, M. P. (2006). Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Marine Pollution Bulletin* 53(5–7), 287–304.
- Martins, L. K. P., Nascimento, I. A., Fillmann, G., King, R., Evangelista, A. J. A., Readman, J. W. & Depledge, M. H. (2005). Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environmental Research*, 99(2), 387–396.
- Moraes, D. S. L. & Jordão, B. Q. (2002). Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista Saúde Pública*, 36(3), 370–374.
- Nacif, PGS. *Ambientes naturais da bacia hidrográfica do rio Cachoeira, com ênfase nos domínios pedagógicos*. (2000). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Tese de Doutorado em Solos.
- Neto, M. A., Silva, W. O. da, Rameiro, F. C., Nascimento, E. S. do & Alves, A. de S. (2012). *Arquivos do Instituto Biológico*, 79(3), 397–403.
- Nogueira, D. J., Castro, S. C. & Sá, O. R. (2009). Utilização de brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG. *Revista Brasileira de Zoociências*, 11(3), 227–232.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S. & Vernet, G. (2000). Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology*, 50, 109–124.
- Paulo, D. V., Fontes, F. M. & Flores-Lopes, F. (2012). Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 1–10.

- Peebua, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P. & Singhakaew, S. (2008). Histopathological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* in acute and subchronic alachlor exposure. *Journal of Environmental Biology*, 29(3), 325–331.
- Pereira, R. S. (2004). Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. *Revista eletrônica de recursos hídricos*, UFRGS, 1(1), 20–36.
- Perendija, B. R., Despotovic, S. G., Radovanovic, T. B., Gavric, J. P., Borković Mitic, S. S., Pavlovic, S. Z., Ognjanovic, B. I., Simic, S. B., Pajovic, S. B. & Saicic, Z. S. (2011). Biochemical and ultrastructural changes in the liver of european perch (*Perca fluviatilis*L.) in response to cyanobacterial bloom in the gruz̃a reservoir *Archives of Biologica Sciences*, Belgrade, 63(4), 979–989.
- Pinho, A. G., (2001). *Estudo da qualidade das águas do rio Cachoeira-Região Sul da Bahia*. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.
- Poleksic, V. & Mitrovic-Tutundzic, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In Müller, R. & Lloyd, R., Ed. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish* (339–352). Cambridge: Cambridge University Press.
- Rocha, R. M., Coelho, R. P., Montes, C. S., Santos, S. S. D. & Ferreira, M. A. P. (2010). Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) da Baía do Guarujá, Belém, Pará. *Ciência Animal Brasileira*, 11(1), 101–109.
- Schiavetti, A., Schilling, A. C. & Oliveira, H.T. (2002). Caracterização sócio-ambiental da bacia hidrográfica do rio Cachoeira Sul da Bahia, Brasil. In Schiavetti, A. & Camargo, A.F.M. *Conceitos de bacias hidrográficas: teorias e aplicações* (141–161). Ilhéus: Editus Editora.
- Stehr, C. M., Johnson, L. L. & Myers, M. S. (1998). Hydropic vacuolation in the liver of three species of fish from the U.S. West Coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 32(2), 119–135.
- Stentiford, G. D., Longshaw, M., Lyons, B. P., Jones, G., Green, M. & Feist, F. W. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55(2), 137–159.
- Van Dyc, J. C., Pieterse, G. M., Van Vuren, J. H. J. (2005). Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 432–440.

Vieira, D. B. & Shibatta, O. A. (2007). Peixes como bioindicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, 7(1), 57–65.

ANEXO (Normas da Revista)

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in LaTeX. Please use Springer's LaTeX macro package and choose the formatting option "twocolumn".

The submission should include the original source (including all style files and figures) and a PDF version of the compiled output.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)
- Word files are also accepted. In this case, please use Springer's Word template for preparing your manuscript.
- [Word template \(zip, 154 kB\)](#)

Headings

Please use the decimal system of headings with no more than three levels.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P., et al. (2001). Writing labs and the Hollywood connection. *Journal of Film Writing*, 44(3), 213–245.

- Article by DOI

Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine*, doi:10.1007/s001090000086

- Book

Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). *APA guide to preparing manuscripts for journal publication*. Washington, DC: American Psychological Association.

- Book chapter

O’Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Men’s and women’s gender role journeys: Metaphor for healing, transition, and transformation. In B. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107–123). New York: Springer.

- Online document

Abou-Allaban, Y., Dell, M. L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). Religious/spiritual commitments and psychiatric practice. Resource document. American Psychiatric Association. http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf. Accessed 25 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 3 kB)
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
 - Definition: Black and white graphic with no shading.
 - Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
 - All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
 - Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
 - Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.
- Color Art
- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted

to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.