



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Marinha, Aquática e Costeira

Trabalho de Culminação de Estudos II

Variante: Investigação

Caracterização morfológica e molecular de uma nova espécie do género *Trilobovarium* (Digenea: Opecoelidae) de *Sillago sihama* (Osteichthyes: Sillaginidae) dos mangais da Ilha da Inhaca, Maputo, Sul de Moçambique

Autora: Agnes Alice Álvaro Costa

Maputo, 02 de Dezembro de 2024



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia Marinha Aquática e Costeira

Trabalho de Culminação de Estudos II
Variante: Investigação

**Caracterização morfológica e molecular de uma nova espécie do género
Trilobovarium (Digenea: Opecoelidae) de *Sillago sihama* (Osteichthyes:
Sillaginidae) dos mangais da Ilha da Inhaca, Maputo, Sul de Moçambique**

Autora:

Agnes Alice Álvaro Costa

Supervisor:

Prof. Doutor José Chissiu Dumbo

Co-supervisor:

Prof. Doutor Paolo Ramoni-Perazzi

Maputo, 02 de Dezembro de 2024

Agradecimentos

Ao dono dos meus dias, Deus Pai Todo Poderoso, que tem manifestado a sua bondade, amor e cuidado por mim todos os dias, Ele que é a maior força nos momentos de angústia e desespero.

Quero expressar minha profunda gratidão à Agência Italiana de Cooperação para o Desenvolvimento, cujo financiamento, por meio do Projecto ManGrowth (Preservação dos Ecossistemas para o Desenvolvimento Sustentável – AID 012432/01/2), foi indispensável para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, Álvaro Costa e Sónia Tembe, que aceitaram a missão de cuidar de mim e o fazem muito bem; eles constituem suporte em todos momentos da minha vida.

A minha querida irmã, Joyce Costa, pelo exemplo de força e superação, e por ter mostrado que tudo é possível desde que queiramos e nos esforcemos para a concretização.

Ao meu parceiro, Ângelo Marranguene pelas incontáveis vezes que constituiu suporte e incentivo, pelo carinho, atenção, cumplicidade e pelo incansável apoio em tudo que precisei.

Inestimável agradecimento endereço aos meus Supervisores, Prof. Doutor José Chissiu Dumbo e Prof. Doutor Paolo Ramoni pelo apoio prestado, dedicação, confiança e paciência; vossa visão crítica e construtiva durante as fases do trabalho foram cruciais para o sucesso. As minhas amigas e companheiras de batalha, Érica Latifa, Sharmélia Marrengula, Érica Chissano, Nimwene Linguaze e Mully Sunde que partilharam as dores, dificuldades e conquistas durante o curso. Ciro Santana por sua amizade e por todo apoio prestado durante esses quatro anos e a Cléa da Conceição, companheira de vida.

Ao meu amado sobrinho, Cayce Nathan por constituir motivação.

E aos demais colegas, amigos e familiares, que directa ou indirectamente contribuíram para a realização do meu trabalho.

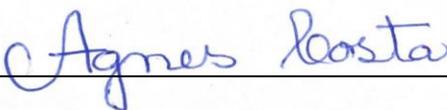
Eterna gratidão!

Deus me ama e cuidou de mim.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, **Agnes Alice Álvaro Costa**, declaro por minha honra que o presente trabalho intitulado: “Caracterização morfológica e molecular de uma nova espécie do género *Trilobovarium* (Digenea: Opecoelidae) de *Sillago sihama* (Osteichthyes: Sillaginidae) dos mangais da Ilha da Inhaca, Maputo, Sul de Moçambique”, é resultado da minha investigação e da orientação pelos meus supervisores, estando citadas ao longo do texto e no capítulo de referências bibliográficas, todas as fontes por mim consultadas; o mesmo nunca foi apresentado para a obtenção de qualquer grau académico nesta Universidade ou em qualquer outra instituição.

Maputo, 02 de Dezembro de 2024



(Agnes Alice Álvaro Costa)

Dedicatória

Aos meus pais, Álvaro Costa e Sónia Tembe, para quem nunca existirão palavras suficientes para qualificar o que representam em minha vida.

Resumo

Entre as subclasses do filo Platyhelminthes, Digenea é um grupo com alta diversidade morfológica e ecológica e possivelmente o maior e o mais bem sucedido entre os endoparasitas metazoários. Devido as características peculiares do seu ciclo de vida, este grupo é de interesse significativo na parasitologia aquática. O presente trabalho teve como objectivo examinar as características morfológicas e morfométricas de espécimes de digenéticos encontrados na pescadinha, *Sillago sihama* (Osteichthyes: Sillaginidae), com particular atenção em características taxonómicas. As colectas foram realizadas entre os meses de Março e Maio de 2024, em duas áreas localizadas na Ilha da Inhaca: o canal do mangal da Noge e em frente a Estação de Biologia Marítima de Inhaca (EBMI), Distrito Municipal KaNyaka, Cidade de Maputo. O trabalho consistiu na identificação e necropsia do hospedeiro e posterior colecta de parasitas. Os espécimes de digenéticos foram colectados no trato digestivo da pescadinha, fixados e processados para o exame em microscopia óptica, electrónica de varredura e análise molecular. Para a microscopia óptica, os espécimes foram fixados por compressão em solução Álcool-formol-ácido acético (AFA) entre lâmina e lamela e conservados em etanol 70%; e, para microscopia electrónica de varredura os espécimes foram preservados em etanol a 70%. Para a análise genética, os espécimes de parasitas digenéticos colectados foram limpos em solução fisiológica e preservados através de fixação em etanol à 96%. Uma vez aplicada a taxonomia integrada que envolve uma combinação dessas técnicas, foi evidente que os espécimes analisados constituem um táxon não conhecido cuja a característica mais notável é o maior comprimento do corpo (1513–4087 μm) dentro do género, e a presença da bolsa de cirrus que se estende até a região posterior a ventosa ventral diferindo assim de todos os seus congéneres. A formação de um clado distinto evidencia que os espécimes colectados na Baía de Maputo, Ilha da Inhaca representam uma espécie genética e morfologicamente não conhecida na ciência.

Palavras-chaves: Opecoelidae, Digenea, mangais, Inhaca, morfologia, genética.

Lista de figuras

Figura 1: Mapa da Ilha de Inhaca localizada na Cidade de Maputo, Sul de Moçambique, mostrando sua inserção em Moçambique e em África.	10
Figura 2: Esquema de medições feitas em <i>S. Sihama</i>	12
Figura 3: <i>Trilobovarium</i> n. sp. colectados no intestino da pescadinha, <i>Sillago sihama</i> . A. Desenho em linha de um espécime inteiro em posição ventral; B. Fotomicrografias de um espécime corado pelo carmim e montado em bálsamo de Canadá.	20
Figura 4: Estrutura superficial de <i>Trilobovarium</i> n. sp. colectado no intestino de <i>S. sihama</i> . (A) Fotomicrografia da face ventral de um espécime inteiro de <i>Trilobovarium</i> n. sp.; (B) e (D). poro genital com a bolsa de cirrus; (C). posição da ventosa ventral e poro genital; (E). ventosa oral localizada na região anterior.	23
Figura 5: Árvore filogenética pelo método Neighbor-Joining (N-J) de espécies de digenéticos baseadas em sequências de (ITS) rDNA 5.8S.2 extraídas do GenBank evidenciando as novas sequências serem distintas de <i>Trilobovarium parvatis</i>	26

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sumário de espécies conhecidas pertencentes ao gênero <i>Trilobovarium</i> , seus hospedeiros e local de ocorrência.	8
Tabela 2: Lista dos materiais usados durante a pesquisa.	11
Tabela 3: Comparação de medidas morfométricas em μm (salvo com indicação)a entre espécimes da nova espécie de <i>Trilobovarium</i> e de espécies anteriormente descritas.	21
Tabela 4: Divergência de sequências bases no total de diferenças de pares de bases do fragmento 5.8S entre as espécies similares da família Opecoelidae.	25

Índice

1. Introdução	1
1.1. Problema de estudo	3
1.2. Justificativa.....	4
2. Objectivos.....	4
2.1. Geral:.....	4
2.2. Específicos	4
3. Hipóteses	5
3.1. Nula	5
3.2. Alternativa.....	5
4. Revisão bibliográfica.....	6
5. Metodologia.....	9
5.1. Área de estudo.....	9
5.2. Amostragem	11
5.3. Exame do hospedeiro	12
5.4. Colecta dos parasitas	12
5.5. Morfologia por microscopia de luz	13
5.6. Morfologia por microscopia electrónica de varredura (MEV).....	13
5.7. Extração de ADN, reacção em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento.....	14
6. Resultados.....	16
7. Discussão.....	27
8. Conclusão	29
9. Limitações	30
10. Recomendações.....	30
11. Referências bibliográficas.....	31

1. Introdução

Parasitismo é o modo de vida no qual o parasita vive em contacto ou dentro de outro organismo, e é uma das formas mais bem-sucedida e disseminada entre os invertebrados enquanto parasitas (Lucius *et al.*, 2017). O filo Platyhelminthes Minot, 1876 representa a transição evolutiva dos organismos de vida livre para vida parasitária (Roberts *et al.*, 2009), e grande maioria são espécies de vida parasitária constituída por organismos das classes Cestoda e Trematoda (Littlewood, 2015). O filo apresenta três classes, nomeadamente: Turbellaria, Trematoda e Cestoda (Roberts *et al.*, 2009).

A Classe Trematoda é um grupo morfológica e ecologicamente mais diverso entre os platelmintes (Stephen e Overstreet, 2008). Os tremátodes são maioritariamente hermafroditas e reproduzem-se por fertilização cruzada ou autofertilização (Silva, 2017). A classe é composta por duas subclasses, nomeadamente Digenea Carus, 1963 e Apidogastrea Faust e Tang, 1936 (Hernández-Mena *et al.*, 2016). A subclasse Apidogastrea constitui o menor grupo e contém cerca de 61 espécies pertencentes a 13 gêneros organizados em quatro famílias, sendo a subclasse Digenea a maior delas constituída por 150 famílias, 24 superfamílias e duas ordens: Diplostomida e Plagiorchiida (Littlewood *et al.*, 2015).

A ordem Diplostomida é a menor e menos diversificada do que a Plagiorchiida contendo aproximadamente 1477 espécies, agrupadas em 210 gêneros, 19 famílias e três superfamílias (Littlewood *et al.*, 2015). As espécies desta ordem parasitam os vertebrados tetrápodes (hospedeiros definitivos), com excepção de diplostomídeos do sangue de peixes que pertencem a família Aporocotyliidae Odhner, 1912 (Kostadinova e Pérez-del-Olmo, 2014). Por sua vez, a ordem Plagiorchiida compreende uma variedade de tremátodes que exibem diversas formas. Inclui digenéticos com notáveis diferenças morfológicas como a ausência ou presença de ventosas, cercárias com caudas simples ou bifurcadas (Cribb *et al.*, 2003) e contém cerca de 131 famílias e 21 superfamílias (Littlewood *et al.*, 2015).

A subclasse Digenea é caracterizada por uma ventosa oral que circunda a boca e uma ventosa ventral com a função de fixação ao hospedeiro e para locomoção (Makepeace *et al.*, 2012; Bakhoun *et al.*, 2017). Esta subclasse é representada por endoparasitas comuns em uma variedade de hospedeiros vertebrados (Ruppert *et al.*, 2005).

Os digenéticos são um grupo de interesse significativo na parasitologia aquática por serem específicos quanto ao hospedeiro e pelo seu comportamento heteroxênico (necessidade de mais de

um hospedeiro para completar o seu complexo ciclo de vida). O ciclo de vida complexo, inclui estágios de vida livre e parasitária e necessita de três hospedeiros para atingir o estágio adulto (de Almeida *et al.*, 2013; Noga, 2010). Neste ciclo, os crustáceos e moluscos actuam como hospedeiros intermediários; os peixes são tanto hospedeiros intermediários como definitivos e as aves e mamíferos piscívoros actuam exclusivamente como hospedeiros definitivos (Noga, 2010).

Entre os platelmintos, os digenéticos são um grupo com maior diversidade morfológica e ecológica (Stephen e Overstreet 2008), e possivelmente o maior e o mais bem sucedido grupo de endoparasitas metazoários com alta diversidade, com mais de 18000 espécies pertencentes à 2500 gêneros organizados em 150 famílias e 25 superfamílias (Bray *et al.*, 2008; Bakhoun *et al.*, 2017). Registos de parasitas digenéticos em espécies de peixes continuam a crescer com descobertas de novas características taxonómicas e localizações geográficas (Cribb *et al.*, 2001; Bakhoun *et al.*, 2017; Silva, 2017)

Dentre as espécies de digenéticos descritos em Moçambique constam *Masenia nkomatiensis* Dumbo, Dos Santos & Avenant-Oldewage, 2019, *Glossidium pedatum* (Looss, 1899), *Orientocreadium batrachoides* (Tubanguí, 1931) e *Emoleptalea mozambiquensis* (Curran *et al.*, 2021); *Rhipidocotyle lamberti* (Reimer, 1985) e *R. tonimahnkei* (Reimer, 1985) (Reimer, 1985; Dumbo *et al.* 2019 a,b; Curran *et al.*, 2021). Recentemente, Dumbo *et al.* (2024) reportaram a ocorrência de duas espécies novas de *Rhipidocotyle* na Baía de Maputo (em publicação). Macuácuva (2010) desenvolveu um estudo de metazoários parasitas de peixe Serra, *Scomberomorus commersoni* (Lacépède, 1800), na Baía de Maputo, contudo não foi concluída a identificação dos espécimens de digenéticos encontrados.

O peixe *Sillago sihama* (Osteichthyes: Sillaginidae) localmente conhecido por pescadinha, é um peixe comum e de importância comercial. No geral, é um peixe de corpo alongado, focinho pontiagudo, perfil superior da cabeça ligeiramente convexo; possui uma boca com dentes pequenos, terminais e viliformes presentes nas mandíbulas e no vômer; a primeira barbatana dorsal é mais alta do que a segunda, com 11 espinhos fracos; a segunda barbatana dorsal com um espinho e 20 a 23 raios moles; uma barbatana anal com dois espinhos e 21 a 23 raios moles e possui uma bexiga natatória com duas extensões pós-celômicas (Shamsan, 2008). O corpo apresenta cor marrom prateado e mel, com face ventral mais leve; parte terminal da barbatana caudal é escura; uma mancha escura na base da barbatana peitoral; a barbatana anal apresenta frequentemente com uma margem branca (Philipose *et al.*, 2017).

Os peixes dependem do mangal durante todo ou parte do seu ciclo de vida. Três hipóteses principais são levantadas para explicar tal dependência: (i) redução da predação ligada à profundidade, estrutura e turbidez; (ii) aumento da oferta de alimentos para as pós-larvas e os juvenis; e (iii) abrigo em águas calmas (não turbulentas) para as pós-larvas e juvenis (Blaber, 2007). O ecossistema do mangal tem importância significativa para muitos grupos marinhos, dentre eles os peixes e crustáceos comercialmente importantes, que servem de viveiros vitais e aumento significativo da produtividade em águas adjacentes (Kathiresan e Bingham, 2001). Estudos como os de Júnior e Hassane (2005), Cuinhane (2019) e Macamo *et al.* (2021) também relataram a importância do mangal para o desenvolvimento de espécies.

Para além da floresta de mangal constituir habitat para o crescimento e alimentação, espécies como *S. sihama* também utilizam o mangal para a maturação e desova (Muchanga *et al.*, 2024).

A pescadinha é um peixe omnívoro que ocupa os níveis mais baixos da cadeia alimentar tornando-a de importância ecológica (Vanza *et al.*, 2022). Sua preferência alimentar varia com o tamanho do peixe; alimenta-se principalmente de pequenos invertebrados bentônicos como moluscos, crustáceos e poliquetas, além de detritos orgânicos (Khan *et al.*, 2014; Sawant *et al.*, 2017).

No presente estudo, espécimes de digenéticos foram colectados no trato digestivo da pescadinha, fixados e processados para o exame em microscopia óptica, electrónica de varredura e análise molecular. A utilização de técnicas combinadas visa a correcta determinação taxonómica, factor essencial para que se possa chegar às generalizações e conclusões confiáveis a respeito da ecologia, patogenicidade e epidemiologia de qualquer digenético (Vieira, 2020; Dias, 2021).

1.1. Problema de estudo

A Ilha de Inhaca é uma área com uma alta diversidade faunística permitindo várias interações ecológicas e fácil complementação do ciclo de vida das espécies (Macnae e Kalk, 1969; Mabote 1997). Esta apresenta uma alta diversidade de peixes com mais de 490 espécies que constitui fonte de alimentação dos habitantes da Ilha, assim como da Cidade de Maputo. Espécimes de parasitas da família Opecoelidae foram encontrados no intestino da pescadinha, *S. sihama*, colectados na área do mangal da Noge e numa área aberta em frente da EBMI, Ilha da Inhaca. A identidade desses espécimes é desconhecida. Os estudos taxonómicos de Opecolídeos para além de serem marcados por descrições antigas, apresentam grandes mudanças na literatura em relação a alocação nas famílias e géneros (Bray *et al.*, 2008). Actualmente, estudos relacionados a análise biológica

baseiam-se não apenas em critérios morfológicos, muitas vezes intimamente ligados às condições ambientais, mas também em técnicas moleculares como PCR que fornecem os produtos adequados e específicos para a correcta caracterização, distinção e conservação da diversidade genética (Kadri, 2020)

Pergunta de pesquisa: “*Os espécimes de opecolídeos colectados no intestino de Sillago sihama da Ilha de Inhaca representam uma espécie de digenético com características morfológicas e moleculares distintas e ainda não descritas?*”

1.2. Justificativa

As novas espécies de parasitas podem desempenhar papéis ecológicos importantes servindo de indicadores das interações comunitárias e da biologia do hospedeiro (Bray, 2020; Costa, 2022) para além do impacto que pode causar em uma comunidade biológica através da regulação de um predador ou espécies de presa importante (Minchella e Scott, 1991; Machado, 2019). A caracterização morfológica e molecular permite revelar relações evolutivas e as características fenotípicas relevantes. As combinações das metodologias tradicionais com as novas poderão solucionar os problemas evidentes nas espécies já descritas e por descrever (Smith *et al.*, 2008; Dias, 2021)

2. Objectivos

2.1. Geral:

- Examinar as características morfológicas, morfométricas e genéticas de digenéticos encontrados em *S. sihama*, com particular atenção em importantes características taxonómicas.

2.2. Específicos

- Comparar a anatomia e morfologia dos espécimes colectados e seus congéneres, por forma a determinar a sua identidade taxonómica e sua distinção dentro do género;
- Caracterizar os espécimes, geneticamente, pelo isolamento de fragmentos 5.8S rDNA e compará-los com dados de sequências disponíveis no banco de sequências (Genbank);
- Descrever os espécimes colectados tendo em conta a morfometria, microscopia de luz e de varredura;

- Construir uma chave dicotómica actualizada para identificação de espécies de *Trilobovarium* spp actualmente conhecidos;
- Determinar os índices parasitários e populacionais dos espécimes colectados em *S. sihama*.

3. Hipóteses

3.1. Nula

- ❖ Os espécimes de *Trilobovarium* sp. colectados em *S. sihama* representam um táxon conhecido e descrito.

3.2. Alternativa

- ❖ Os espécimes de *Trilobovarium* sp. colectados em *S. sihama* representam morfológica e geneticamente um táxon distinto e não descrito.

4. Revisão bibliográfica

Os peixes em áreas tropicais costeiras e estuarinas estão frequentemente ligados aos mangais, por estes constituírem áreas de alta diversidade de espécies e inter-relações complexas (Blaber, 2007). Os mangais são uma componente importante dos ecossistemas entre-marés pois, para além de ser fonte de nutrientes, constitui área de viveiro, protecção da costa, local de alimentação e nidificação e habitat para muitas espécies (de Boer *et al.*, 2002; Muchanga *et al.*, 2024).

Vários grupos de animais utilizam a floresta de mangal para fins diversos, dentre eles os peixes, um grupo comum entre os vertebrados (Pereira, 2004). É nesse ecossistema que são estabelecidos vários tipos de relações ecológicas sendo uma delas, o parasitismo. A presença de parasitas em peixes pode comprometer seu desenvolvimento, uma vez que o parasita depende, fisiológica e biologicamente do seu hospedeiro (Portz *et al.*, 2013)

A família Opecoelidae Ozaki, 1925 é uma das maiores e mais diversificada entre os tremátodes encontrados em teleósteos marinhos e de água doce em todo mundo (Cribb, 2005; Martin *et al.*, 2017). A família compreende mais de 900 espécies pertencentes a 90 géneros (Bray *et al.*, 2016). O conceito de família é baseado no trabalho de Ozaki (1925) que propôs *Opecoelus* como género-tipo e *O. sphaericus* Ozaki, 1925 como espécie-tipo (Cribb, 2005). A família Opecoelidae já foi considerada como pertencente a superfamília Brachycladioidea Odhner, 1905 ou Opecoeloidea Ozaki, 1925 (vide Curran *et al.*, 2006; Littlewood *et al.*, 2015).

Na família Opecoelidae existem vários géneros com elevado número de espécies, tais como: *Plagioporus* Stafford, 1904 com cerca de 55 espécies, *Podocotyle* Dujardin, 1845 com 55 espécies, *Macvicaria* Gibson & Bray, 1982 com 51 espécies, *Coitocaecum* Nicoll, 1915 com 50 espécies, *Opecoelus* Ozaki, 1925 com 43 espécies, *Opegaster* Ozaki, 1928 com 37 espécies, *Pseudopecoelus* Von Wick-len, 1946 com 37 espécies e *Neolebouria* Gibson, 1976 com 25 espécies (Bray *et al.*, 2016). Todavia, as características distintivas entre os géneros não são consistentes, resultando em problemas de limites e validação de géneros, razão pela qual existem constantes discussões e discordâncias (Bray *et al.*, 2016).

Os opecoelídeos não são facilmente identificados como digenéticos, sendo reconhecidos por um conjunto de características quase todas comuns em outras famílias. No geral, os opecoelídeos possuem tegumento liso, ventosas orais e ventrais, pré-faringe e faringe, dois cecos e vesícula excretora em forma de “P”. O sistema reprodutivo compreende de dois a dez testículos e genitália terminal masculina que apresenta uma bolsa de cirro que envolve uma vesícula seminal. Os ovos

com cerca de 40–80 mm de comprimento, são marrom-amarelados e operculados. Ocasionalmente, possuem filamentos em uma ou ambas as extremidades ou são muito pequenos (Cribb, 2005).

O ciclo de vida descrito para uma espécie do género-tipo e muitas outras estabelece a natureza biológica da família. Normalmente, os ovos não embrionados são eliminados nas fezes. O ovo embriona e eclode libertando um miracídio que emerge para penetrar no caramujo prosobrânquio por penetração activa e este é o primeiro hospedeiro intermediário. Duas gerações de esporocistos dentro do gastropode levam à produção de cercárias cotilocercas, estiletos, que escapam para infectar uma variedade de segundo hospedeiro intermediário. A metacercária se desenvolve dentro do segundo hospedeiro intermediário, que deve ser ingerido pelo hospedeiro definitivo para completar a vida ciclo (Cribb, 1985). As metacercárias dos opecoelídeos são geralmente bem desenvolvidas e a progênese é bastante comum dentro da família (Cribb, 2005).

Como parte da resolução dos géneros mais problemáticos da subfamília Plagioporinae Manter, 1947: *Plagioporus*, em que as espécies tinham ovário distintamente sub-esférico ou oval e vitelária confluyente na região anterior do corpo, e *Podocotyle*, as espécies tinham um ovário lobulado (geralmente trilobado) e o ovário e vitelária restritos a região posterior do corpo. O género *Neolebouria* foi incorporado em géneros semelhantes a *Plagioporus*, com um ovário irregularmente lobulado e vitelária confluyente na região anterior (Gibson, 1976), actuando como um conceito intermediário entre os dois maiores géneros acima (Gibson e Bray, 1982).

Com base na combinação de evidências morfológicas, dados moleculares, a ecologia do hospedeiro e a biogeografia, Martin *et al.* (2017) criaram o género *Trilobovarium* Martin, Cutmore & Cribb, 2017 para incorporar todas as espécies com um ovário dextral, regular e geralmente trilobado, testículos lisos, um corpo anterior ocupando aproximadamente um terço do comprimento total do corpo, um saco cirrus que não está projectado no corpo posterior e geralmente com menos ovos e mais pequenos. Actualmente, nove espécies são conhecidas infectando teleósteos marinhos segundo consta na Tabela 1.

Tabela 1: Sumário de espécies conhecidas pertencentes ao gênero *Trilobovarium*, seus hospedeiros e local de ocorrência.

Espécies	Hospedeiro	Local de descrição	Referência
<i>T. ira</i> (Yamaguti, 1940) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	<i>Choerodon azurio</i>	Japão	Harold (1990)
<i>T. truncatum</i> (Linton, 1940) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	<i>Cynoscion regalis</i> , <i>Menticirrhus saxatilis</i> , <i>Morone americana</i> e <i>Synodus foetens</i>	Hole Massachusetts, EUA	Linton (1940)
<i>T. diacopae</i> (Nagaty & Abdel Aal, 1962) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	<i>Diacope fulviflama</i> (hebra)	Mar Vermelho, Egito	Nagaty e Aal, (1962)
<i>T. krusadaiense</i> (Gupta, 1956) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	Peixe gato marinho não identificado	Golfo de Manaar, Índia	Gupta (1956);
<i>T. khalili</i> (Ramadan, 1983) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	<i>Lethrinus mahsena</i>	Mar Vermelho, Índia	Ramadan (1983)
<i>T. lineatum</i> (Aken'Ova & Cribb, 2001) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	<i>Centroberyx lineatus</i> (Cuvier) (Berycidae)	Próximo à Ilha Rottnest, sudoeste da Austrália Ocidental	Aken'Ova e Cribb (2001)
<i>T. moretonense</i> (Aken'Ova & Cribb, 2001) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	<i>Gerres subfasciatus</i> (Cuvier) (Gerreidae)	Baía de Moreton, sudoeste de Queensland	Aken'Ova e Cribb (2001)
<i>T. palauensis</i> (Machida, 2004) Martin, Cutmore & Cribb, 2017	Peixe bodião não identificado (Labridae)	Palau, Oeste de Caroline	Machida (2004)
<i>T. parvatis</i> Martin, Cutmore e Cribb, 2017	<i>Lethrinus nebulosus</i> (Forsskål)	Lizard Island, GBR	Martin <i>et al.</i> (2017)

5. Metodologia

5.1. Área de estudo

A Ilha de Inhaca localiza-se a leste da Cidade de Maputo e enquadra-se no prolongamento dos cordões adunares costeiros que bordejam a costa moçambicana desde a Ponta de Ouro à Baía de Maputo, entre 26° de latitude Sul, e 33° de longitude Este; 32 km a Este da Cidade de Maputo. Com 42 km² de área, tem um comprimento máximo de 12 km e largura de 6,5 km, estando separado do continente pelo canal Golada de Santa Maria (Rebêlo *et al.*, 2013). A Ilha tem forma de “N” invertido por causa das suas praias Norte e Sul serem profundamente recortadas pelas baías (Jocene, 1997)

O clima da Inhaca é tropical húmido moderado com duas estações distintas: seca e chuvosa (Pereira *et al.*, 2016). A estação chuvosa é quente designada também de verão, compreende aos meses de Novembro a Abril e a estação fria e seca (inverno), os meses de Maio a Outubro. A temperatura da água do mar varia de 18°C a 32°C (Mafambissa *et al.*, 2023). A salinidade da água e canais associados ao mangal assim como o solo é variável. A cada maré alta a salinidade oscila abaixo de 35‰. Nas marés mortas o pH da água pode baixar até 7,6 e durante as marés vivas com o mangal inundando o pH atinge cerca de 8,4 (Macnae e Kalk, 1962).

A parte Oriental da Ilha é caracterizada por fortes correntes e ondas enquanto que a parte ocidental é mais protegida. As marés são semi-diurnas e têm amplitude máxima de 3,1 m em marés altas (Mafambissa *et al.*, 2023). Parte da Inhaca constitui uma área protegida, Reserva Parcial da Ilha da Inhaca decretada em 1965. A floresta de mangal ocupa uma área de aproximadamente 500 hectares, 12% da área total da Ilha (De Boer *et al.*, 1999; Muacanhia, 2003) representado pelas áreas do Saco da Inhaca, Chichuane e Inguane. O Saco de Inhaca é uma área que apresenta diversos habitats (áreas lodosas, ervas marinhas, corais, mangais e bancos de areia) e sofrem grandes amplitudes de marés, ficando 80% da superfície imersa durante as marés baixas extremas (Kalk, 1995).

Para o presente trabalho, as colectas foram realizadas entre os meses de Março e Maio de 2024, em duas áreas localizadas na Ilha da Inhaca: o canal do mangal da Noge e em frente da Estação de Biologia Marítima de Inhaca (EBMI) e os pontos foram devidamente assinalados na Figura 1.

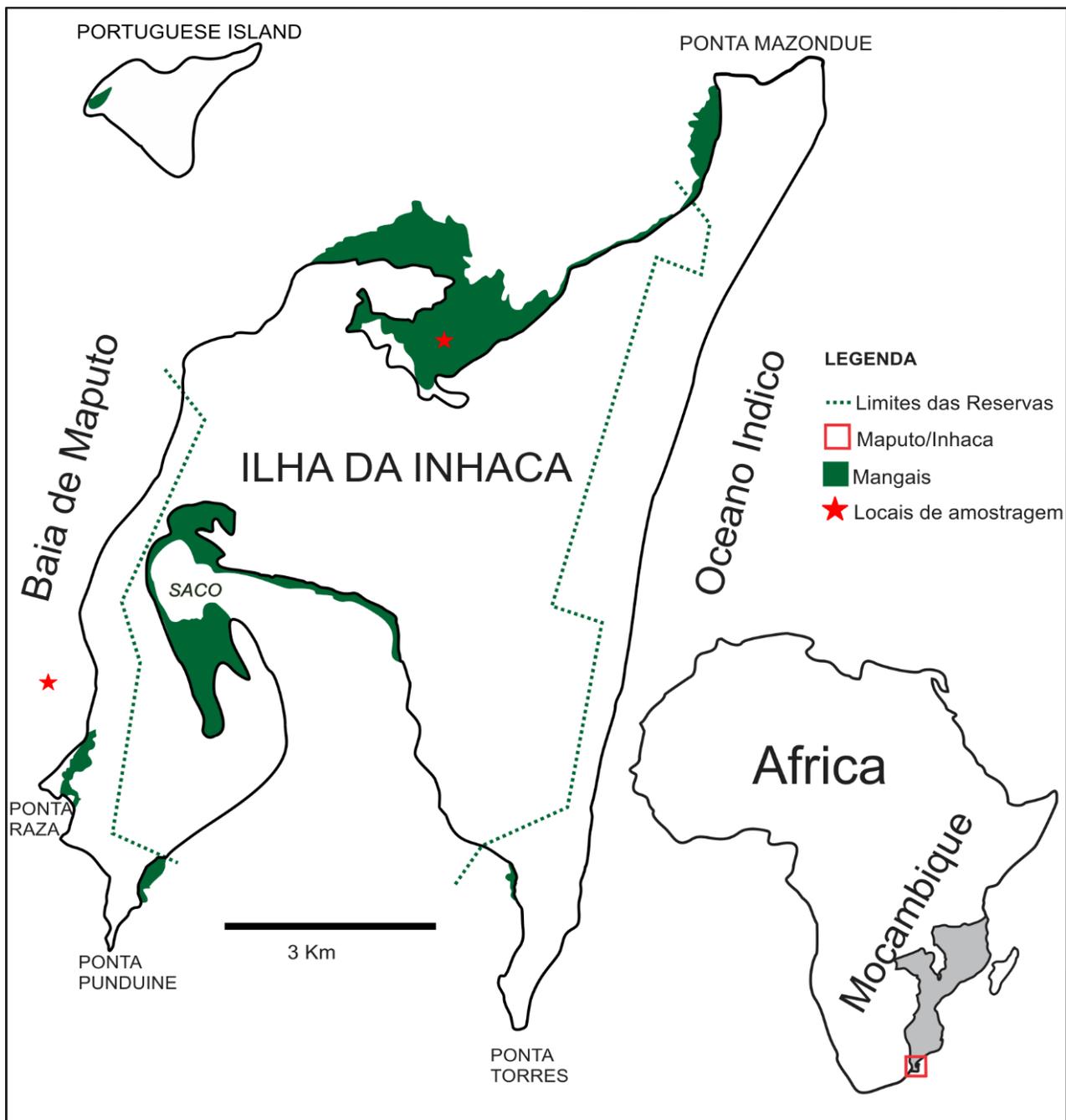


Figura 1: Mapa da Ilha de Inhaca localizada na Cidade de Maputo, Sul de Moçambique, mostrando sua inserção em Moçambique e em África. Dois pontos de amostragem são indicados pelas (★). Fonte: autora, 2024.

Tabela 2: Lista dos materiais usados durante a pesquisa.

Materiais		
Equipamentos	Reagentes	Material de escritório
Placas de Petri	Etanol 70, 80, 90, 95 e 100%	Guia de identificação
Tesoura	H ₂ O destilada	Bloco de notas
Bisturi	Acetocarmina	Lápis de carvão
Pinças	Álcool-formol-ácido acético (AFA)	Caneta
Agulhas	Creosoto	Borracha
Estufa	Bálsamo de Canadá	
Luvas	Hexametildisilazano (HMDS): 40, 70 e 100%	
Estereomicroscópio		
Balança electrónica		
Ictiómetro		
Microscópio óptico composto		
Microscópio electrónico de varredura		
Computador portátil (Laptop)		
Emscope SC 500 (counting)		
Frascos plásticos de tamanho médio		
GPS		

5.2. Amostragem

No presente estudo, as colectas foram realizadas entre os meses de Março e Maio de 2024 em duas áreas localizadas na Ilha da Inhaca: o canal do mangal da Noge e em frente da Estação de Biologia Marítima de Inhaca (EBMI). O peixe foi adquirido junto dos pescadores locais nos pontos previamente designados e com o auxílio do GPS foram retiradas as coordenadas geográficas. Os espécimes foram levados ao laboratório da EBMI para posterior identificação, necropsia e colecta de parasitas.

5.3. Exame do hospedeiro

Inicialmente, o peixe colectado foi identificado até ao nível de espécie com auxílio do guia de campo das espécies comerciais marinhas e de águas salobras de Moçambique (Fischer *et al.*, 1990). De seguida foi feita a biometria (peso em gramas; P), comprimento total (CT) e o padrão (CF) em centímetros, para complementar as informações referentes ao hospedeiro (Jerônimo *et al.*, 2020). No presente estudo foi analisado um total de 36 espécimes pertencente a espécies *S. sihama*.

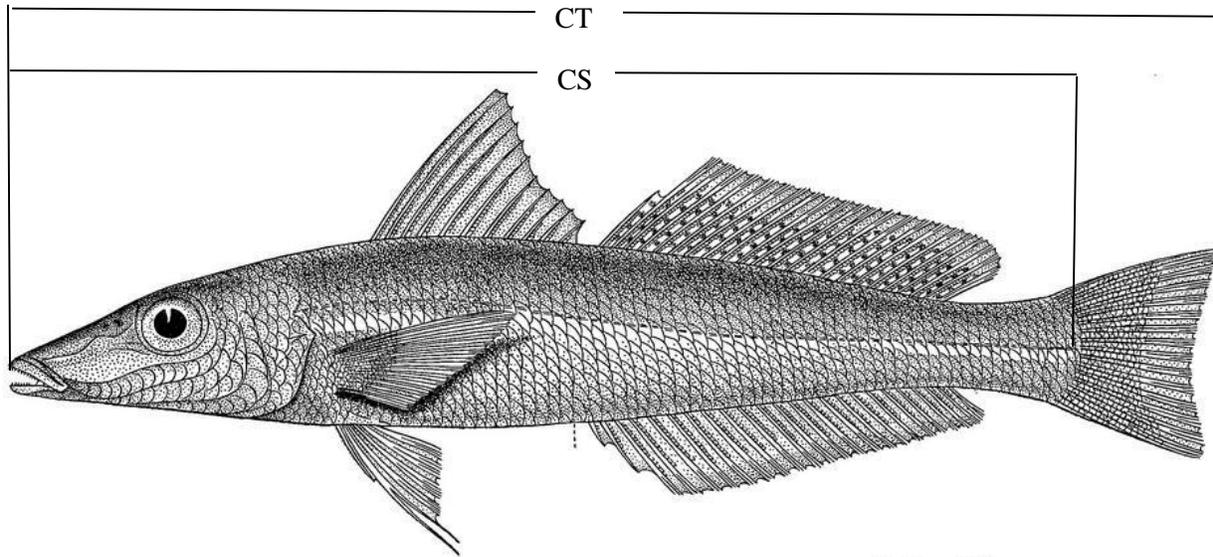


Figura 2: Esquema de medições feitas em *S. Sihama*. Linha CT- comprimento total, medido desde a ponta do focinho até a extremidade superior da barbatana caudal. CS- comprimento padrão, abrange a ponta do focinho até a base da barbatana caudal. **Fonte:** fishbiosystem.ru/PERCIFORMES/SILLAGINIDAE/Sillago_sihama1.html .

5.4. Colecta dos parasitas

Os peixes foram necropsiados por uma incisão desde a região anal até a região anterior e de seguida fez-se a remoção do tubo digestivo seguindo-se de exposição dos órgãos anexos em placa de Petri contendo água destilada. Com o auxílio de uma tesoura sob uma lupa, fez-se uma abertura longitudinal do tubo digestivo e o conteúdo foi colocado numa placa de Petri onde foi adicionada a solução fisiológica para diluição do muco. Posteriormente, fez-se a colecta dos parasitas com auxílio de um pincel e agulha, a medida em que os detritos alimentares não digeridos no estômago eram descartados;

Os espécimes de parasitas colectados pertencentes ao grupo de digenéticos foram limpos em solução fisiológica com auxílio de pincéis e conservados através da fixação em etanol à 96% para

a análise genética. Para a microscopia óptica, os espécimes foram fixados por compressão em solução Álcool-formol-ácido acético (AFA) entre lâmina e lamela onde permaneceram durante 48 horas; uma vez comprimidos, os espécimes de parasitas foram conservados em etanol 70%. Para microscopia electrónica de varredura os espécimes foram conservados em etanol a 70%.

5.5. Morfologia por microscopia de luz

Os espécimes preservados em etanol 70% foram transferidos para a acetocarmina e permaneceram por minutos para ao processo de coloração; uma vez corados, os parasitas foram transferidos de acetocarmina para uma solução de álcool-ácido (0,5% ácido clorídrico em 70%) para diferenciação. Os parasitas passaram por uma série alcóolica de 70, 80, 90 e 96% por 15 minutos cada e transferidos para etanol absoluto (100%) por 30 minutos para a desidratação. Posteriormente, foram clarificados em creosoto e montados em bálsamo de Canadá (Bakke, 1986). Foram preparadas 26 lâminas que após etiquetadas, foram colocadas a secar em uma estufa à 60°C. Após a secagem dos espécimes fez-se as medições.

As fotomicrografias e os parâmetros morfométricos foram obtidos com auxílio de AxioCam HRc acoplada ao microscópio composto Axionplan 2 com recurso ao software ZEN (ZEISS Efficient Navigation). As fotomicrografias foram utilizadas para compilar as ilustrações digitais pelo Corel DRAW® Graphics Suite X6 software (Corel Corporation, Ottawa, Canada). Todas as medições referem-se os espécimes montadas em Bálsamo de Canadá e foram apresentadas em micrômetros (µm), salvo indicação contrária, por um intervalo seguido pela média apresentada em parênteses (Tabela 3).

5.6. Morfologia por microscopia electrónica de varredura (MEV)

Os espécimes conservados em etanol 70% foram gradualmente desidratados por meio de uma série alcóolica de 70, 80, 90 e 96% por 15 minutos cada e transferidos para etanol absoluto (100%) por 30 minutos. De seguida foram transferidas para uma solução de hexametildisilazano (HMDS) em concentração de 40% (60ml de etanol absoluto + 40 de HMDS) e 70% (30ml de etanol absoluto + 70 de HMDS) por 15 minutos cada e por HDMS absoluto (100%) por 30 min (Dos Santos *et al.* 2015). Os espécimes foram montados em *stubs* com recurso a adesivo de carbono e colocados a secar em um secador por pelo menos 48 horas. Após secagem, os espécimes foram cobertos por

uma camada de ouro em um Emscope SC 500 e visualizados no microscópio electrónico de varredura à 6KV.

5.7. Extração de ADN, reacção em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

Porções de tecido de dois espécimes, um com muito (>30) e outro poucos (<30) ovos fixados em etanol 96% foram removidos da extremidade posterior e rehidratados através de uma série etflica e lavados em água durante a noite. O Acído Desoxiribonucleíco (ADN) foi extraído com recurso ao kit E.Z.N.A.® Tissue DNA (Omega Bio-tek, Inc., GA, USA) seguindo os procedimentos do fabricante.

Uma região internal transcribed spacer (ITS) rDNA 5.8S.2 foi amplificada utilizando 81_f (5' – GTA ACA AGG TTT CCG TAG GTG AA – 3') (Gustinelli *et al.*, 2010) e ITS2:2 (5' – CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC – 3') (Cribb *et al.*, 1998). As reacções de PCR compreenderam um volume total de 30µl, efectuada sob seguintes condições: 5 min a 95°C seguido de 35 ciclos por 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 52°C, 2 minutos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O resultado da amplificação foi verificada em um gel de agarose 1% impregnated com um SafeView™ Classic (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Canada) e visualizados utilizando um gel de visualização SmartDoc™ 2.0 e um sistema de imagem de smartphone (Accuris instruments, Edison, NJ, USA). Amplicons foram sequenciados em ambas direcções conforme Avenant-Oldewage *et al.* (2014).

Os dados de sequência obtidos foram alinhados, editados, se necessário, leituras mescladas e comparadas usando o MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Os dados gerados foram alinhados a táxons intimamente relacionados seguindo análises da Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990). Apenas dados cobrindo pelo menos 80% do alinhamento foram consideradas e sequências idênticas para dados conspecíficos foram removidas. Dados com identificação duvidosa também foram excluídos. Os dados foram alinhados e refinados manualmente no MEGA 11. Distâncias genéticas representados por diferença de pares de bases foram calculadas usando MEGA 11. Histórias evolutivas foram reconstruídas usando abordagens de Neighbor-Joining (N-J) (Saitou e Nei, 1987). O modelo de substituição de nucleotídeos Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) foi selecionado para análises o método ML usando a ferramenta de selecção de modelos no MEGA 11, com distribuição Gamma discreta (cinco categorias) incluída. Topologias foram suportadas por 1.000 réplicas bootstrap (Felsenstein, 1985). A

topologia do marcador analisado é apresentada com base em Neighbor-Joining. Os nós de suporte inconclusivo (menos de 50% de suporte bootstrap ou probabilidade posterior de 0,5) não foram anotados e foram marcados com hífen “-”.

6. Resultados

Uma vez aplicada a taxonomia integrativa que envolve uma combinação de técnicas tais como uso de microscopia óptica, microscopia electrónica de varredura e análise molecular mostrou que os espécimes constituem um táxon não conhecido.

Taxonomia

Filo: Platyhelminthes Minot, 1876

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Plagiorchiida La Rue, 1957

Superfamília: Opecoeloidea Ozaki, 1925

Família: Opecoelidae Ozaki, 1925

Subfamília: Plagioporinae Manter, 1947

Género *Trilobovarium* Martin, Cutmore & Cribb, 2017

Trilobovarium sp. nov.

Descrição: Corpo alongado com 1512,8–4086,8 (2532,7) µm de comprimento por 461,2–1208,8 (828,5) µm de largura; tegumento liso sem espinhos, ventosa oral subglobular, ventralmente subterminal, aproximadamente 1/3 do tamanho da ventosa ventral com 80,8–190,1 (128,3) por 94,2–208,5 (142,7); Três pares de papilas presentes em cada lado na margem anterior à ventosa oral. Ventosa ventral arredondada, maior que a oral, posicionada imediatamente anterior a região mediana do corpo, medindo 195,5–423,9 (289) por 207,2–463,4 (299,4) largura. O lúmen de ambas ventosas com poucas papilas. Proporção de comprimento da ventosa oral *versus* ventosa ventral é 1: 0,40–0,5 (1: 0,5); proporção da largura 1: 0,4–0,7 (1,0: 0,5). Pré-faringe curta 22,3–67,8 (45,1) em comprimento, ausente na maioria de espécimes; faringe oval com 50,3–147,3 (88,6) por 52,5–169,7 (101,3). Esófago não especializado com 77,7–320,7 (187,9) de comprimento; o ceco intestinal bifurca-se na região anterior em dois ramos cecais entre o poro genital e ventosa ventral; os ramos cecais são uniformes em toda sua extensão e terminam na extremidade posterior do corpo, especificamente na margem posterior do testículo posterior.

Dois testículos subovais, lisos e em tandem, ligeiramente separados, intercecais, em posição posterior ocupando a área central; testículo anterior com 141,8–434,8 (276,6) por 154,7–536,5 (362,3); testículo posterior 152–531,8 (303,5) por 161,2–500,5 (346,3); distância pós-testicular com 328,0–956,1 (557,4) correspondendo 22,6 % do comprimento total do corpo. Bolsa de cirrus presente, alongado, de forma tubular, estendendo-se posteriormente até ao nível médio do corpo de 408,2–1085,3 (665,5) por 42,6–112,3 (66,0), posterior à ventosa ventral e sinistral; a bolsa encerra uma vesícula seminal interna longa, oval sigmóide com 187,0–629,9 (352,7) por 31,6–91,1 (56); ducto ejaculatório curto e simples que termina no átrio genital. *Pars prostatica* presente e curtos. Células prostáticas elípticas envolvendo um ducto ejaculatório; Ducto ejaculatório curto relativamente à vesícula seminal, e abre no interior do poro genital. Poro genital de formato oval, ventral, distintamente na região anterior à bifurcação, sinistral, submediano, ao nível do esofago, com uma textura semelhante a rendas.

Ovário dextral imediatamente pré-testicular, intercecal, com três lóbulos, adjacente ao testículo anterior medindo 106,4–351,4 (208,4) por 95,9–357,7 (196,9). O ovário ocupa o espaço entre o testículo anterior e a margem posterior do útero próximo a região terminal do ceco dextral.

O oviduto corre da margem anterior do ovário a partir do receptáculo seminal, passando então pela glândula de Mehlis e se abre no útero; o receptáculo seminal em forma de rim, sacular, sobreposto pelo ovário medindo 89,3–354,2 (146,5) por 61,5–172,2 (86); canal de Laurer abre dorsalmente no início do oviduto e próximo do receptáculo seminal; ducto vitelínico transversal conecta folículos em cada lado; vitelária em dois campos laterais contínuos a partir da margem anterior à bifurcação do ceco intestinal, intra e extracecal, confluentes dorsalmente no região anterior; folículos vitelínicos em formato irregular e numerosos. O útero se estende anteriormente a partir da margem anterior do ovário, procedendo dorsalmente à ventosa ventral e ao lado da bolsa de cirro abrindo-se no átrio genital; metratermo não observado. Útero preenchido por ovos em número de 22–76, operculados medindo 61,8–76,9 (70,6) por 29,4–55,8 (49,2). Vesícula excretora do tipo I atingindo testículos.

Sumário taxonómico

Hospedeiro: *Sillago sihama* (Forsskål, 1775) (Sillaginidae), pescadinha comum

Localidade: Mangais da Ilha de Inhaca, Baía de Maputo, Moçambique

Mangal da Noge: S 25° 59.943' E 032° 56.981'

Estação de Biologia Marítima: S 26.038452, E 32.899271

Material-tipo: 1 holótipo e 25 parátipos

Local: Intestino.

Prevalência: 41,7%

Intensidade média: 2,5

Abundância média: 1,0

Chave dicotômica para as espécies de *Trilobovarium*

A actualização da chave dicotômica de Martin *et al.* (2017) proposto no presente trabalho é baseada na combinação de seguintes características morfométricas e morfológicas: comprimento do corpo, contorno dos testículos, posição do ovário em relação ao poro genital, bolsa de cirro, campos vitelínicos com ou sem interrupção a nível da ventosa ventral, que foram utilizadas para distinguir as espécies de *Trilobovarium*.

1a Corpo excedendo 2000 μm	2
1b Corpo não excedendo 2000 μm	5
2a Testículos lobulados.....	3
2b Testis com contorno liso.....	<i>T. diacopae</i>
3a Ovário sinistral.....	<i>T. khalili</i>
3b Ovário dextral	4
4a Bolsa de cirro anterior à ventosa ventral.....	<i>T. ira</i>
4b Bolsa de cirro extendendo-se para a região pós-ventosa ventral.....	<i>Trilobovarium n. sp.</i>
5a Poro genital ao nível do esófago.....	<i>T. lineatum</i>
5b Poro genital no nível posterior da margem posterior da faringe.....	6
6a Vesícula excretora estende-se até ao testículo anterior.....	<i>T. moretonense</i>
6b Vesícula excretora não atinge o testículo anterior.....	7
7a Útero estende-se para além do testículo anterior.....	8
7b Útero estende-se até o nível do ovário.....	<i>T. truncatum</i>
8a Campos vitelínicos contínuos em toda extensão	<i>T. krusadaiense</i>
8b Campos vitelínicos com interrupção no nível da ventosa ventral.....	<i>T. palauense</i>

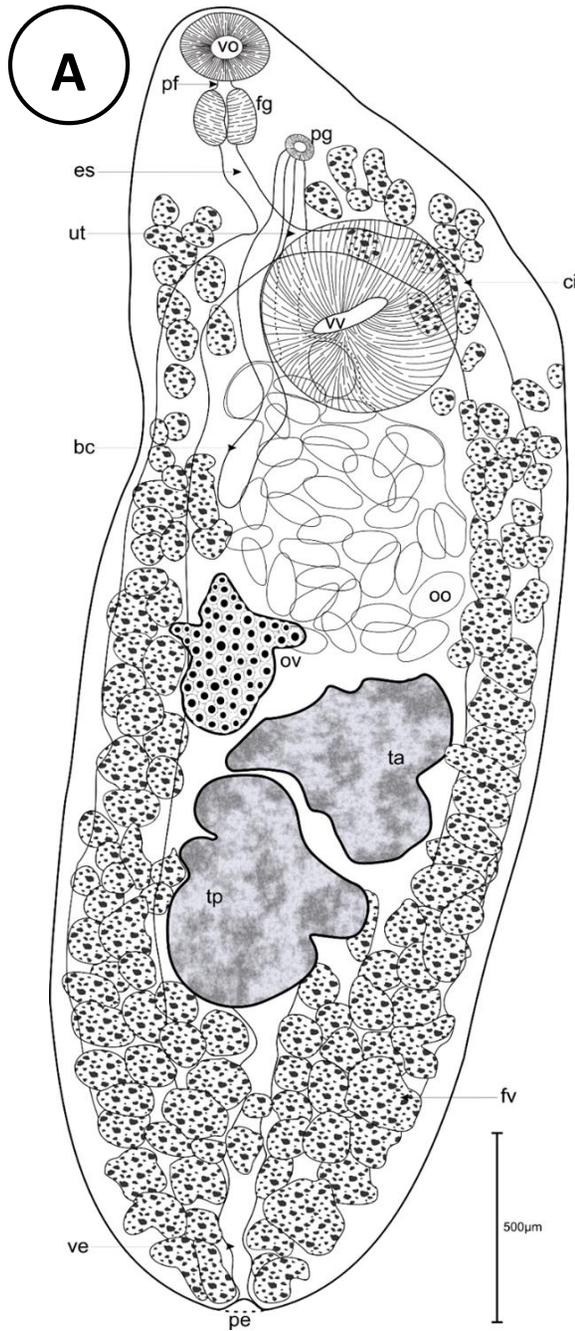


Figura 3: *Trilobovarium* n. sp. colectados no intestino da pescadinha, *Sillago sihama*. A. Desenho em linha de um espécime inteiro em posição ventral; B. Fotomicrografias de um espécime corado pelo carmim e montado em bálsamo de Canadá. vo- ventosa oral; es- esófago; pf- pré-faringe; fg-faringe; pg-poro genital; ut- útero; ci- ceco intestinal ; vv- ventosa ventral; bc- bolsa de cirrus ; oo-ovo; ov- ovário; ta- testículo anterior; tp-testículo posterior; fv- folículos vitelíneos; ve- vesícula excretora; pe- poro excretor.

Tabela 3: Comparação de medidas morfométricas em μm (salvo com indicação) a entre espécimes da nova espécie de *Trilobovarium* e de espécies anteriormente descritas.

Referências	Presente estudo	Aken'Ova e Cribb (2001)	Dronen <i>et al.</i> (2014)	Nagaty e Aal (1962)	Aken'Ova e Cribb (2001)	Ramadan (1983)	Aken'Ova e Cribb (2001)	Aken'Ova e Cribb (2001)	Machida (2004)	Martin <i>et al.</i> (2017)
Espécies	<i>Trilobovarium n. sp.</i>	<i>T. ira</i>	<i>T. truncatum</i>	<i>T. diacopae</i>	<i>T. krusadaiense</i>	<i>T. khalili</i>	<i>T. lineatus</i>	<i>T. moretonensis</i>	<i>T. palauensis</i>	<i>T. parvva</i>
Comprimento do corpo	1512.83–4086.83 (2532.72)	1900–2100 (2000)	800–1.065 (898)	2.18	780–1330	1700–3100	710–920 (790)	780–870 (820)	1510–1930	634–1371 (894)
Largura do corpo	461.16–1208.81 (828.549)	500–550 (530)	350–520 (447)	0.92	342–588	830–1050	212–259 (245)	252–316 (276)	0.62–0.73	203–499 (351)
Forebody	292.81–984.45 (534.491)	–	198–322 (270)	–	–	–	252–308(270)	246–285 (266)	–	22–42 (33)%
Comprimento VO	80.81–190.05 (128.28)	125–130	94–107 (102)	0.23	163	210–320	57–76 (69)	77–84 (82)	0.13–0.17	79–171 (108)
Largura VO	94.2–208.46 (142.65)	160	78–103 (94)	0.20	159	230–310	76–94 (84)	84–94 (87)	0.14–1.18	77–172(123)
Comprimento VV	195.47–423.87 (289.011)	250–275	169–200(190)	0.42	245	290–530	107–143 (124)	126–180 (149)	0.07–0.10	76–227 (174)
Largura VV	207.23–463.4 (299.386)	260	187–237 (216)	0.40	321	370–510	116–136 (128)	146–187 (161)	0.10–0.13	169–297 (222)
Comprimento da faringe	50.3–147.26 (88.637)	105	54–62 (59)	0.08	71	120–130	32–49 (42)	35–48 (43)	0.07–0.10	43–71 (57)
Largura da faringe	52.53–169.74 (101.305)	99–105	47–77 (65)	0.09	65	80–110	46–54 (51)	53–59 (55)	0.10–0.13	50–90 (68)
Esófago	77.73–320.67 (187.884)	0.1–0.12	31–91(69)	0.23	–	50	–	–	0.04–0.13	4–55
Comprimento SC	408.2–1085.3 (665.513)	–	280–298 (289)	–	–	130–320	155–218(188)	182–230(208)	0.61–0.840	127–417 (252)
Largura SC	42.63–112.34 (65.999)	–	36–75 (56)	–	–	120	38–51 (42)	51–61 (54)	10–0.15	38–110 (6)
Comprimento TA	141.84–434.8 (276.608)	–	130–148 (141)	–	–	180–260	69–93 (79)	80–118 (100)	0.13–1.200	43–164 (8)

Largura TA	154.65–536.38 (362.317)	–	145–177 (162)	–	–	110–210	60–88 (78)	128–156 (144)	18–0.29	50–184 (117)
Comprimento TP	151.97–531.75 (303.53)	–	117–161(138)	–	–	180–260	87–107(96)	117–138(126)	0.17–0.28	47–196 (100)
Largura TP	161.22–500.51 (346.25)	–	164–250 (198)	–	–	100–180	82–99 (88)	122–158 (137)	0.21–0.29	45–198 (119)
Distancia pós-testicular	327.98–956.11 (557.438)	–	164–190 (175)	–	–	–	129–170(143)	132–156(142)	12–18%	5–29 (20)
Comprimento Ovário	106.4–351.39 (208.415)	–	78–120 (102)	0.15	–	160–210	78–97 (89)	72–115 (98)	0.10–0.160	45–125(8)
Largura do Ovário	95.89–357.67 (196.954)	–	86–101(96)	0.17	–	90–240	69–85 (74)	90–115 (103)	10–0.17	43–105 (7)
Comprimento do ovo	61.8–76.88 (70.589)	75–82	60–70 (64)	0.06	66–70	64–68	52–75 (65)	56–72 (65)	66–73	48–68 (58)
Largura do ovo	29.35–55.766 (42.302)	42–47	32–39 (35)	0.05	44–53	37–41	27–49 (36)	26–42 (33)	40–48	28-39 (33)

Abreviatura: VO- ventosa oral; VV- ventosa ventral; SC- bolsa de cirro; TA- testículo anterior; TP- testículo posterior.

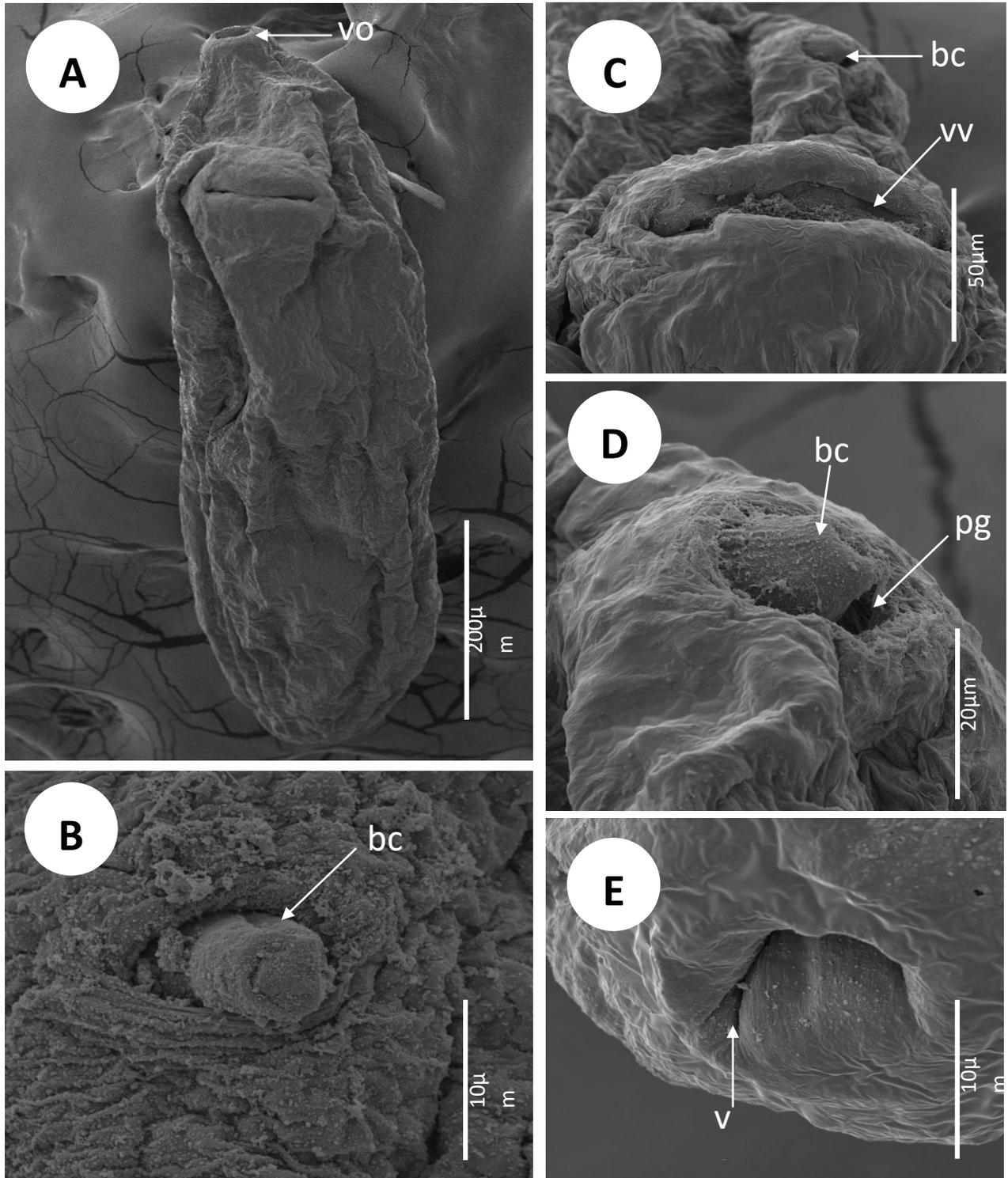


Figura 4: Estrutura superficial de *Trilobovarium* n. sp. coletado no intestino de *Sillago sihama*. (A) Fotomicrografia da face ventral de um espécime inteiro de *Trilobovarium* n. sp.; (B) e (D). poro genital com a bolsa de cirrus; (C). posição da ventosa ventral e poro genital; (E). ventosa oral localizada na região anterior. Abreviaturas: bc- bolsa de cirrus; vo- ventosa oral; vv- ventosa ventral; pg- poro genital.

Análise molecular

As sequências de fragmentos de ITS, no presente estudo, foram obtidas com sucesso para dois espécimes de *Trilobovarium*. BLAST das sequências obtidas confirmaram a similaridade com outra sequência *T. parvvatis* existente no banco de sequências (Genbank). A divergência evolutiva entre as sequências baseada em p-distância foi entre 0 à 193 pb. *Trilobovarium* n. sp. foi mais próxima de *T. parvvatis* por 177 e 185 pb (48,9 à 50,5%) (vide Tabela 4). A formação de um clado distinto, segundo a Fig. 4, os espécimes colectados na Baía de Maputo representam uma espécie genética e morfologicamente não descrita na ciência.

Tabela 4: Divergência de seqüências bases no total de diferenças de pares de bases do fragmento 5.8S entre as espécies similares da família Opacoelidae.

Seqüências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
<i>Pseudopycnadena fischthali</i>																								
1 <i>Trilobovarium parvatis</i>	44																							
2 <i>Macvicaria mormyri</i>	9	47																						
3 <i>Macvicaria bartolii</i>	10	46	1																					
4 <i>Macvicaria maillardi</i>	10	48	1	2																				
5 <i>Macvicaria crassigula</i>	10	46	1	0	2																			
6 <i>Macvicaria alacris</i>	9	45	8	9	9	9																		
7 <i>Macvicaria crassigula</i>	10	48	1	2	2	2	9																	
8 <i>Gaevskayatrema perezii</i>	9	47	8	9	9	9	2	9																
9 <i>Pachycreadium carnosum</i>	6	46	7	8	8	8	9	6	9															
10 <i>Podocotyloides australis</i>	21	49	22	23	23	23	24	23	24	23														
11 <i>Podocotyloides gracilis</i>	19	49	22	23	23	23	24	23	24	23	2													
12 <i>Macvicaria dubia</i>	9	45	4	5	5	5	8	5	8	5	24	24												
13 <i>P. citerovarium</i>	35	51	33	34	32	34	35	34	37	33	32	34	31											
14 <i>Macvicaria obovata</i>	9	45	4	5	5	5	8	5	8	5	24	24	0	31										
15 <i>Magnosimum brooksae</i>	16	47	16	17	17	17	18	17	18	16	26	24	18	38	18									
16 <i>P. brevivesiculatus</i>	21	49	22	23	23	23	24	23	24	23	2	4	24	30	24	28								
17 <i>Pacificreadium serrani</i>	35	53	37	38	37	38	39	38	39	39	23	25	37	37	37	42	23							
18 <i>Cainocreadium labracis</i>	31	50	31	32	32	32	35	32	35	32	23	25	30	31	30	36	23	23						
19 <i>Allopodocotyle epinepheli</i>	25	57	28	29	29	29	30	29	30	27	24	26	30	41	30	31	25	35	28					
20 <i>Allopodocotyle heronensis</i>	26	59	29	30	30	30	31	30	31	28	26	28	31	43	31	32	27	37	30	4				
21 <i>Trilobovarium n. sp. (+ov)</i>	172	177	175	175	175	175	174	174	5	6	1	9	5	3	5	2	9	4	178	185	187			
22 <i>Trilobovarium n. sp. (-ov)</i>	182	185	185	185	185	185	184	184	18	18	18	18	18	18	19	18	19	18	19					
23 <i>Trilobovarium n. sp. (-ov)</i>	182	185	185	185	185	185	184	184	5	5	8	6	4	1	4	0	6	2	186	193	195	30	-	-

Abreviações: *P. citerovarium* = *Polypipapiliotrema citerovarium*; *P. brevivesiculatus* = *Podocotyloides brevivesiculatus*; +ov = número de ovos superior à 30; -ov = número de ovos inferior à 30.

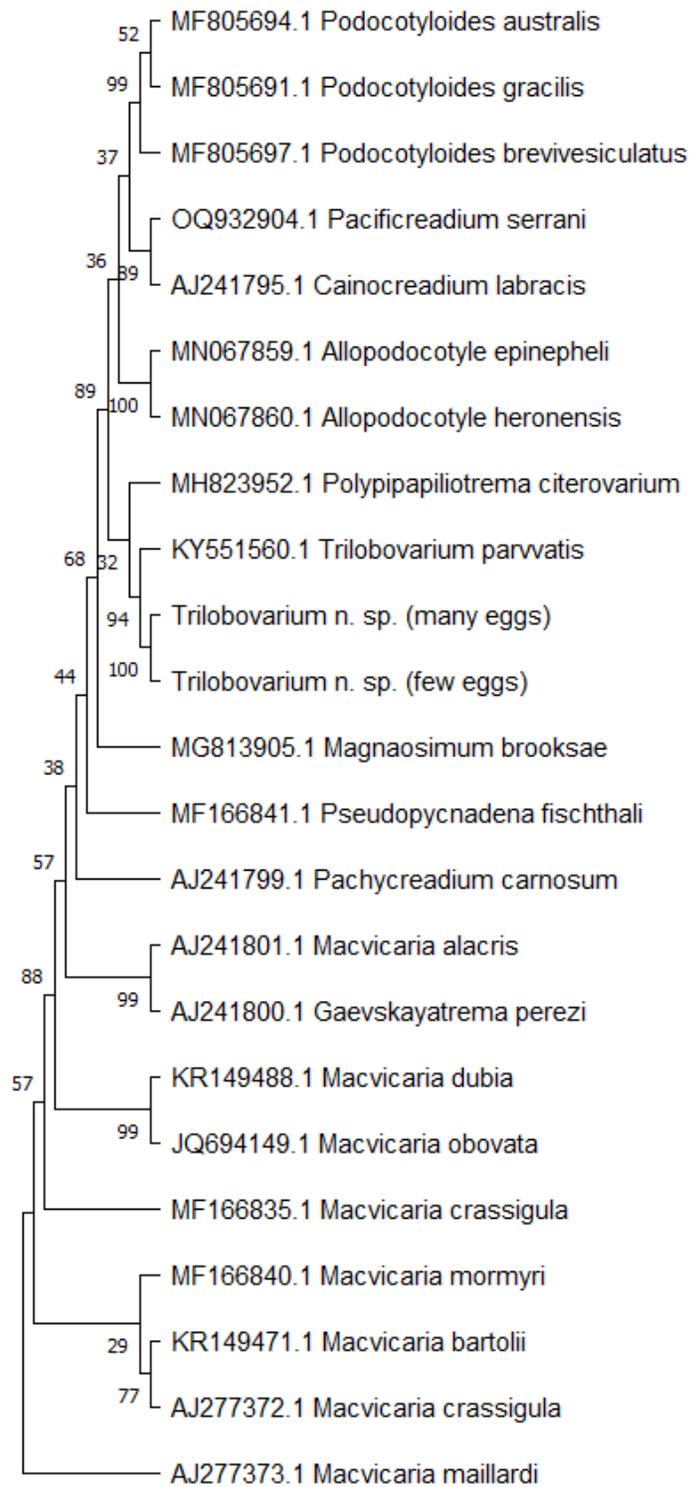


Figura 5: Árvore filogenética pelo método Neighbor-Joining (N-J) de espécies de digenéticos baseadas em sequências de (ITS) rDNA 5.8S.2 extraídas do GenBank evidenciando as novas sequências serem distintas de *Trilobovarium parvvatis*.

7. Discussão

Análise morfológica

Espécimes de *Trilobovarium* n. sp. foram encontrados infectando os intestinos de um peixe tropical/subtropical, *S. sihama*, na Baía de Maputo. Isto corrobora com Martin *et al.* (2017), que afirmaram que as espécies do género *Trilobovarium* são conhecidas de peixes tropicais/subtropicais da região Indo-Oeste do Pacífico, excepto *T. truncatum* conhecido apenas do Oceano Atlântico e a única de águas temperadas. Entre os membros do *Trilobovarium*, três espécies tem um comprimento superior à 2000 µm nomeadamente, *T. diacopae* (2180 µm), *T. ira* (1850–2050 µm) e *T. khalili* (1700–3100 µm) (Nagaty e Aal, 1962; Ramadan, 1983; Martin *et al.* 2017). A característica mais notável da nova espécie é o maior comprimento do corpo (1513–4087 µm), diferindo assim de todos os congéneres conhecidos.

A nova espécie *Trilobovarium* n. sp. distingue-se *T. parvatis* pelo tamanho corporal mais pequeno, um poro genital posicionado ao nível da bifurcação, um corpo anterior mais comprido, um saco de cirro mais curto e ovos mais pequenos. *Trilobovarium krusadaiense* é distinto por possuir um comprimento/tamanho mais curto de todas as características medidas, exceto o corpo anterior que é mais longo e os ovos que caem numa gama de tamanho semelhante (Gupta, 1956). *Trilobovarium truncatum* difere de *Trilobovarium* n. sp. pela forma da vesícula seminal, largura e espessura do saco de cirrus, a natureza da *pars prostatica* e a disposição entre o ducto ejaculatório e o metratermo próximo ao átrio genital (Martin *et al.*, 2017). *Trilobovarium lineatum* distinguem-se de *Trilobovarium* n. sp. por apresentar o tamanho de corpo relativamente menor, os cecos terminam mais anterior a margem posterior do testículo posterior em pelo menos um dos lados para além de possuir um ducto ejaculatório longo, rodeado por células glândulares (Aken'Ova e Cribb, 2001). *Trilobovarium palauense* distingue-se da nova espécie *Trilobovarium* n. sp. por possuir o espaço pós testicular menor, 12-18% do comprimento do corpo; corpo anterior mais largo e a vesícula seminal nitidamente em forma de S (Machida, 2004).

Por sua vez, *Trilobovarium ira* é distinto por apresentar menor comprimento do corpo comparativamente a *Trilobovarium* s. np, para além de possuir uma ventosa ventral intercecal, localizada na parte posterior do corpo, região central e folículos vitelíneos iniciando ao nível do esófago (Harold, 1990). A espécie *Trilobovarium* n. sp. distinguem-se de *T. diacopae* por possuir o poro genital distintamente na região anterior à bifurcação, ao nível do esófago quando em *T. diacopae* este é extracecal, ao nível da bifurcação intestinal (Nagaty e Aal, 1962). *T. khalili* difere

de *Trilobovarium* s. n.p pelo formato do corpo, apesar de alongado possui a extremidade da região anterior distintamente narrower do restante do corpo; apresenta um saco de cirrus de forma triangular parcialmente sobreposta à ventosa ventral e testículos oblíquos (Ramadan 1983); e, em *T. moretonensis* o formato do corpo é oval, mais amplamente arredondado posteriormente, ovos relativamente grandes, região pós-testicular curta e apresenta a vitelaria interrompida ao nível da ventosa ventral enquanto que em *Trilobovarium* n. sp. os foliculos vitelinicos estão distribuídos de forma contínua, lateralmente, ocupando toda região posterior (Aken'Ova e Cribb, 2001; Dronen *et al.*, 2014).

Análise genética

O presente trabalho constitui o segundo estudo a realizar a caracterização genética de uma espécie de *Trilobovarium*. A formação de um mesmo clado entre *T. parvatis* e sequências de *Trilobovarium* estudadas no presente estudo, confirma as diferenças morfológicas encontradas provando ser uma espécie não descrita.

Segundo Martin *et al.* (2027), o género *Trilobovarium* apresenta espécies com poucos ovos, em número abaixo de 30 unidades, enquanto os espécimes que apresentam mais de 30 ovos pertencem ao género *Neolebouria*. No presente estudo foram colectados espécimes contendo abaixo de 30 ovos e outros com acima de 30 ovos. Uma vez analisadas as sequências genéticas, espécimes com abaixo de 30 ovos e aqueles com acima de 30 ovos mostraram ser idênticas. Este facto mostra que o número de ovos não constitui uma característica confiável para a delimitação de géneros dentro de uma família.

Pelos dados obtidos no presente estudo, a divergência evolutiva entre as sequências baseada em p-distância mostrou não ser importantes para a discriminação de espécies, sendo assim necessários mais estudos genéticos, incluindo de espécies de diferentes géneros da família Opecoelidae por forma a clarificar os seus limites e conseqüentemente a reclassificação taxonómica.

8. Conclusão

Trilobovarium n. sp. é o primeiro relato do gênero para um peixe silaginídeo, bem como no Oceano Índico, especialmente na África Austral, uma área globalmente importante pela alta biodiversidade e endemismo, mas ainda pouco explorado. A nova espécie apenas foi reportada na Ilha da Inhaca, mas são necessárias mais amostragens ao longo da costa moçambicana para uma compreensão mais clara da sua distribuição geográfica e possivelmente ocorrências de outras espécies do gênero. Apesar dos escassos dados moleculares para o gênero, a reconstrução filogenética permitiu verificar a inserção da nova espécie ao gênero *Trilobovarium*, uma vez que apenas existem dados genéticos para a espécie-tipo, *T. parvvatis*. No entanto, a geração de mais dados moleculares é necessária para esclarecer a taxonomia da família Opecoalidae. Foram calculados três principais parâmetros para a determinação dos índices parasitários sendo a prevalência dos parasitas em *Sillago sihama* de 41,2% evidenciando uma presença significativa de parasitas na população analisada; a intensidade média parasitária de duas-três parasitas por indivíduo e a abundância média igual a um, refletindo a distribuição dos parasitas em toda população analisada. Estes índices revelam uma infestação parasitária moderada, com prevalência notável, mas carga parasitária individual não excessiva.

9. Limitações

- Ausência de material e equipamento especializado para análises moleculares surgindo a necessidade de recorrer a outras instituições científicas;
- Pouca disponibilidade de literatura actualizada sobre o mangal da Ilha de Inhaca e número reduzido de estudos realizados e disponíveis sobre digenéticos em Moçambique.

10. Recomendações

- Realização de estudos complementares, preferencialmente quantitativos, correlacionando o comprimento total, o peso e a relação entre o fator condição e a intensidade parasitária do hospedeiro.
- Realização de um estudo comparativo entre diferentes florestas de mangal da Cidade de Maputo, verificando a ocorrência da nova espécie e a intensidade parasitária do hospedeiro.
- Aquisição de material e/ou parcerias com mais instituições científicas de modo a tornar possível a utilização de técnicas combinadas para que se possa chegar às generalizações e conclusões confiáveis.

11. Referências bibliográficas

1. Aken'Ova, T. O. e T. H. Cribb (2001). Two new species of *Neolebouria* Gibson, 1976 (Digenea: Opecoelidae) from temperate marine fishes of Australia. *Systematic Parasitology*, 49(1): 65–71.
2. Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. M. Myers e D. J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.
3. Avenant-Oldewage, A., L. E. le Roux, S. N. Mashego e B. Jansen van Vuuren (2014). *Paradiplozoon ichthyoxanthon* n. sp. (Monogenea: Diplozoidae) from *Labeobarbus aeneus* (Cyprinidae) in the Vaal River, South Africa. *Journal of Helminthology*, 88: 166–172.
4. Bakhoun, A. J. S., J. Miquel, P. I. Ndiaye, J. L. Justine, A. Falchi, C. T. Bâ, B. Marchand e Y. Quilichini (2017). *Advances in spermatological characters in the Digenea: review and proposal of spermatozoa models and their phylogenetic importance*. In: Rollinson, D. e R. Stothard (Editores.). *Advance Parasitology*. Pp 111–165. London: Elsevier Ltd.
5. Bakke, T. A. (1986). *Urogenimus macrostomus* (Rudolphi, 1803) (Digenea): its taxonomy and morphology as revealed by light and scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Zoology*, 56, 2280–2291.
6. Blaber, S. J. (2007). Mangroves and fishes: issues of diversity, dependence, and dogma. *Bulletin of Marine Science*, 80(3): 457–472.
7. Bray, R. A. (2020). Digenean parasites of deep-sea teleosts: a progress report. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 12: 251–264.
8. Bray, R. A., D. I. Gibson e A. Jones (2008). *Keys to the Trematoda*. 848pp. London, International and Natural History Museum.
9. Bray, R. A., T. H. Cribb, D. T. J. Littlewood e A. Waeschenbach (2016). The molecular phylogeny of the digenean family Opecoelidae Ozaki, 1925 and the value of morphological characters, with the erection of a new subfamily. *Folia Parasitologica*, 63: 1.
10. Costa, A. P. L. (2022). Padrões de interações parasito-hospedeiro em diferentes gradientes ambientais. Tese de doutoramento. 125pp. Curitiba, Universidade Federal do Paraná.
11. Cribb, T. H. (1985). The life cycle and biology of *Opecoelus variabilis*, sp. nov. (Digenea: Opecoelidae). *Australian Journal of Zoology*, 33(5): 715-728.

12. Cribb, T. H., G. R. Anderson, R. D. Adlard e R.A. Bray (1998). A DNA-based demonstration of a three-host lifecycle for the Bivesiculidae (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology*, 28 (11): 1791–1795.
13. Cribb, T. H., R. A. Bray, D. T. J. Littlewood, S. Pichelin e E. A. Herniou (2001). The Digenea. In: Littlewood, D.T. J. e R. A. Bray (Editores). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Pp 168-185. London: Taylor & Francis.
14. Cribb, T. H., R. A. Bray, P. D. Olson e D. T. J. Littlewood (2003). Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. *The Evolution of Parasitism-A Phylogenetic Perspective*, 54:197.
15. Cribb, T. H. (2005). Family Opecoelidae Ozaki, 1925. In: Jones, A., Bray, R. A. e D. I. Gibson, D. I. (Editores). *Keys to the Trematoda Volume 2*. Pp 444-531. Wallingford, UK: CABI Publishing and The Natural History Museum.
16. Cuinhane, C. J. O. (2019). *Estudo preliminar da caracterização sócioeconómica da pesca do caranguejo de mangal (Scylla serrata Forskal 1755) no estuário dos Bons Sinais em Quelimane*. Tese de licenciatura. 41pp. Quelimane, Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras
17. Curran S. S., V.V. Tkach e R. M. Overstreet (2006). A review of *Polylekithum* Arnold, 1934 and its familial affinities using morphological and molecular data, with description of *Polylekithum catahoulensis* sp. nov. *Acta Parasitologica*, 51: 238–248.
18. Curran, S. S., H. R. Dutton, M. B. Warren, L. du Preez e S. A. Bullard (2021). Two new species of Cephalogonimidae Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchioidea) from Africa (Mozambique and Guinea), including a new phylogenetic hypothesis for related plagiorchioids. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 14: 228–240.
19. De Almeida , A. D. C.S., K. D. S. S. de Almeida e S. C. Cohen (2013). Estudo sobre a ocorrência de helmintos Monogenea, Digenea e Nematoda parasitando peixes da espécie *Trachelyopterus striatulus* (Steindachner, 1877)(Siluriformes: Auchenipteridae) provenientes do Rio Guandu (RJ). *Saúde & Ambiente em Revista*, 8(1):1–8.
20. De Boer, W. F. e C. M. Bento (1999). *Birds of Inhaca Island, Mozambique*. 42pp. South Africa, BirdLife.

21. De Boer, W. F. (2002). The rise and fall of the mangrove forests in Maputo Bay, Mozambique. *Wetlands Ecology and Management*, 10: 313–322.
22. Dias, K. G. A. (2021). *Caracterização morfológica e molecular de trematódeos (Digenea) parasitos de peixes Characiformes provenientes da bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil*. Tese de Doutorado. 33pp. São Paulo, Universidade Estadual Paulista (Unesp).
23. Dos Santos Q.M., Jansen van Vuuren B., Avenant-Oldewage A. (2015). *Paradiplozoon vaalense* n. sp. (Monogenea: Diplozoidae) from the gills of moggel, *Labeo umbratus* (Smith, 1841), in the Vaal River System, South Africa. *Journal of Helminthology*, 89: 58–67.
24. Dronen, N. O, C. K. Blend, M. C.O. de Nuñez, S. K. Malhotra e N. Jaiswal (2014). Chaves para as espécies de *Neolebouria* Gibson, 1976 (Digenea: Opecoelidae: Plagioporinae), com redescricao de *Neolebouria truncata* (Linton, 1940). *Parasitologia Sistemática*, 88: 213–225.
25. Dumbo, J. C., A. Avenant-Oldewage e Q. M. Dos Santos (2019 a). Morphological and molecular characterization of *Glossidium pedatum* Looss, 1899 and *Orientocreadium batrachoides* Tubanguui, 1931 from sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *African Zoology*, 54(1): 43–61.
26. Dumbo, J. C., Q. M. Dos Santos e A. Avenant-Oldewage (2019 b). *Masenia nkomatiensis* n. sp. (Digenea: Cephalogonimidae) from *Clarias gariepinus* (Burchell) (Clariidae) in Incomati basin, Mozambique. *Systematic Parasitology*, 96: 311–326.
27. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
28. Fischer, W., C. S. Sousa, A. de Freitas e J. M. Poutiers (1990). *Guia de campo das espécies comerciais marinhas e de águas salobras de Moçambique*. Roma: Publicação preparada em colaboração com o Instituto de Investigação Pesqueira de Moçambique, 494pp.
29. Gibson, D. I. (1976). Monogenea and Digenea from fishes. *Discovery Reports*, 36:179–266.
30. Gibson, D. I. e R. A. Bray (1982). A study and reorganization of *Plagioporus* Stafford, 1904 (Digenea: Opecoelidae) and related genera, with special reference to forms from European Atlantic waters. *Journal of Natural History*, 16: 529–559

31. Gupta, N. K. (1956). Studies on the digenetic trematodes of marine fishes from the Gulf of Manaar (India). *Research Bulletin of the Panjab University*, 89: 61–83.
32. Gustinelli, A., M. Caffara, D. Florio, E. O. Otachi, E. W. Wathuta e M.L. Fioravanti (2010). First description of the adult stage of *Clinostomum cutaneum* Paperna, 1964 (Digenea: Clinostomidae) from grey herons *Ardea cinerea* L. and a redescription of the metacercaria from the Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (L.) in Kenya. *Systematic Parasitology*, 76: 39–51.
33. Harold W. (1990). Manter Laboratory of Parasitology, "Binder 154, Opecoelidae Plagioporinae A-L [Trematoda Taxon Notebooks]" Trematoda Taxon Notebooks. Pp 150.
34. Hernández-Mena, D. I., B. Mendoza-Garfias, C.P. Ornelas-García e G. Pérez-Ponce de León (2016). Phylogenetic position of *Magnivitellinum* Kloss, 1966 and *Perezitrema* Baruš & Moravec, 1967 (Trematoda: Plagiorchioidea: Macroderoididae) inferred from partial 28S rDNA sequences, with the establishment of *Alloglossidiidae* n. fam. *Systematic Parasitology*, 93: 525–538.
35. Jerônimo, G. T., A. S. Ventura, S.B.D. Pádua, E. L. Porto, L.C. Ferreira, M. M. Ishikawa e M. L. Martins (2020). Parasitological assessment in hybrids Serrasalmidae fish farmed in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29(4): e012920.
36. Jocene, D. F. (1997). *Estudo da comunidade Ictiológica e dieta dos peixes do Saco da Ilha de Inhaca*. Tese de licenciatura. 86 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane
37. Júnior, C. e C. Hassane (2005). *Mangais como habitat de camarão, estudo comparativo: no saco da ilha da inhaca e península de Machangulo*. Tese de licenciatura. 79pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane
38. Kadri, K. (2020). Polymerase chain reaction (PCR): principle and applications. In: Nagpal, L., L. M., Boldura, O. M. C. Baltă e S. Enany (Editores). *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. Pp 147-164. London, IntechOpen
39. Kalk, M. (1995). *Uma história natural da Ilha de Inhaca, Moçambique*. Imprensa da Universidade de Witwatersrand.
40. Kathiresan, K. e B. Bingham (2001). Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 40:81–251.

41. Khan, M. A., K. Yousuf e S. Riaz (2014). Food and feeding habits of *Sillago sihama* (Forsskal, 1775) (Family; Sillaginidae) from Karachi Coast. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 1(3): 27–31.
42. Kostadinova, A. e A. Pérez-Del-Olmo (2014). The systematics of the Trematoda. In Toledo, R., Fried, B. (2014). *Digenetic trematodes*. New York: Springer, pp 21–44.
43. Linton, E. (1940). Trematodes from fishes mainly from the Woods Hole region, Massachusetts. *Proceedings of the United States National Museum*, 88: 1-172
44. Littlewood, D. T. J., R. A. Bray e A. Waeschenbach (2015). Phylogenetic patterns of diversity in cestodes and trematodes. *Parasite diversity and diversification: evolutionary ecology meets phylogenetics*, p. 304.
45. Lucius, R., R. Poulin, B. Loos-Frank, R.P. Lane, C. Roberts e R.K. Grensis (2017). General aspects of parasite biology. In *The Biology of Parasites* (pp. 1–93). Wiley-VCH.
46. Mabote, A. B. P. (1997). *Distribuição, composição específica e rendimento da pesca artesanal na Baía Sul de Inhaca e a sua importância na dieta da população*. Tese de licenciatura. 87pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane
47. Macamo, C., D. Nicolau, V. Machava, S. Chitará e S. Bandeira (2021). A Contribution to Mozambique’s Biodiversity Offsetting Scheme: Framework to Assess the Ecological Condition of Mangrove Forests. *BIOFUND Final Report*, Mozambique.
48. Machado, C. M. S. e B. B. Castro (2019). Relações hospedeiro-parasita. *Revista de Ciência Elementar*, 7(4): 076
49. Machida, M. (2004). Four new species of digenean trematodes from wrasses of southern Japan and neighboring waters. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Series A, Zoology*, 30: 105–111.
50. Macnae W. e M. Kalk (1962). The Ecology of the Mangrove Swamps at Inhaca Island, Moçambique. *The Journal of Ecology*, 19–34.
51. Macnae W. E M. Kalk (1969). *A natural History of Inhaca Island*. Revised Edition. 369pp. London, Ernest Benn.
52. Macuácu, A. A. (2010). *Estudo de Metazoários parasitas do peixe serra *Scomberomorus commersoni* Lacépède, 1800 da Baía de Maputo*. Tese de licenciatura. 38pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

53. Mafambissa, M., M. Rodrigues, T. Taimo, C. Andrade, M. Lindegart e A. Macia (2023). Gametogenic Cycle of the Oysters *Pinctada capensis* (Sowerby III, 1890) and *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) (Class Bivalvia) in Inhaca Island, Southern Mozambique: a subsidy for bivalve culture in the region. *Diversity*, 15(3): 361.
54. Makepeace L. B., C. Martin, D. J. Turner e S. Specht (2012). Granulocytes in helminth infection-who is calling the shots? *Current medicinal chemistry*, 19 (10):1567–1586.
55. Martin, S. B., S. C. Cutmore, S. Ward e T. H. Cribb (2017). An updated concept and revised composition for *Hamacreadium* Linton, 1910 (Opecoelidae: Plagioporinae) clarifies a previously obscured pattern of host-specificity among species. *Zootaxa*, 4254(2):151–187.
56. Martin, S. B., S.C. Cutmore, T. H. Cribb (2017). Revision of *Neolebouria* Gibson, 1976 (Digenea: Opecoelidae), with *Trilobovarium* n. g., for species infecting tropical and subtropical shallow-water fishes. *Systematic Parasitology*, 94(3): 307–338.
57. Minchella, D. J., e M. E. Scott (1991). Parasitism: a cryptic determinant of animal community structure. *Trends in Ecology & Evolution*, 6(8): 250–254.
58. Muacanhia, T. (2003). *Environmental Changes on Inhaca Island, Mozambique: Development versus Degradation?* Estação de Biologia Marítima, Maputo.
59. Muchanga, N., A. Mugabe e M. Arcioni (2024). Assessing the role of mangroves for fish species and fisheries in Inhaca, Mozambique. *Faculty of Sciences Deposit number. DL/BNM/1516/2024 ISBN: 979-989-9043-26-8*, 27.
60. Nagaty, H. F. e T. M. A. Aal (1962). Trematodes of fishes from the Red Sea. Part 15. Four new species of *Hamacreadium* family Allocreadiidae. *The Journal of Parasitology*, 384–386.
61. Noga, E. J. (2010) *Fish disease: diagnosis and Treatment*. 2. ed. 544pp. Iowa, EUA: Wiley-Blackwell, 2010.
62. Pereira, M. A. M. (2004). *Recursos turísticos e pesqueiros da zona costeira do distrito de Matutuíne, Maputo*. Report submitted to WWF - Mozambique Coordination Office, 25pp.
63. Pereira, I. J. e E. D. Nascimento (2016). Evaluation of natural resources in the Inhaca Island (Indian Ocean, Mozambique): first approach. *Boletim Goiano de Geografia*, 307–325.
64. Philipose, K. K., J. Loka e T. S. Murugan (2017). *Sillago sihama* (Forsskål, 1775). In: Ranjan, R., M. Muktha, S. Ghosh, A. Gopalakrishnan, G. Gopakumar e J. Imelda (Editor).

- Prioritized Species for Mariculture in India. Pp. 245–249. Kochi, ICAR - Central Marine Fisheries Research Institute.
65. Portz, L., A.M. Antonucci, B.H. Ueda, D. Geovana, G. Guidelli, R. Katina, M.L. Martin, M. K. Carniel e W. L. G. Tavechio (2013). *Parasitos de peixes de cultivo e ornamentais*. Maringá: Eduem. 85–114.
66. Ramadan, M. M. (1983). A review of the trematode genus *Hamacreadium* Linton, 1910 (Opecoelidae), with descriptions of two new species from the Red Sea fishes. *Japanese Journal of Parasitology*, 32: 531–539.
67. Rebêlo, L. P., J. T. Oliveira e A. Sênvano (2013). Ilha da Inhaca: património natural a preservar. *Cooperação entre Portugal e Moçambique na Área das Geociências: 1986–2012*.
68. Reimer, L. W. (1985). Bucephalidae (Digenea) from fishes of coastal waters of Moçambique. *Angewandte Parasitologie*, 26(1): 13-26.
69. Roberts L.S., J. J. Janovy e G. D. Schmidt (2009). *Foundations of parasitology*. 8th ed. 701pp. New York: McGraw-Hill Education
70. Ruppert, E. E., R. S. Fox e R. D. Barnes (2005). *Zoologia dos Invertebrados*. 7ª ed. 1145 pp. Editora Roca, São Paulo.
71. Saitou N. e M. Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406–425.
72. Sawant, P. P., V. H. Nirmale, S. Y. Metar, B. P. Bhosale e N. D. Chogale (2017). Biology of Indian sand whiting, *Sillago sihama* (Forsskal) along the Ratnagiri coast. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 1899–1907.
73. Shamsan, E. F. (2008). *Ecobiology and fisheries of an economically important estuarine fish, Sillago sihama* (Forsskal). PhD thesis. 298pp. India, Goa University.
74. Silva, C. H. S. R. (2017). *Caracterização da fauna de helmintos do trato gastrointestinal de Columba livia (Gmelin, 1789) (Aves, Columbidae) coletados no parque zoobotânico mangal das Graças, Belém, Pará, Brasil*. Tese de licenciatura. 35pp. Belém, Universidade Federal do Pará.
75. Smith, P.J., S. M. Mcvegh e D. Steinke (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, 72: 464–471.

76. Stephen, A. B. e R. M. Overstreet (2008). Digeneans as enemies of fishes. In *Fish Diseases* (2 Vols.) (pp. 831–911). CRC Press.
77. Tamura K. e M. Nei (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3):512–526.
78. Vanza, J. G., R. V. Borichangar, H. G. Solanki e P. P. Patel (2022). A review of the sand whiting *Sillago sihama* (Forsskål, 1775) suitability as a diversified Brackishwater finfish species and its culture potential. *The Phama Innovation Journal*, 3:16–1122.
79. Vieira, D. H. M. D. (2020). *Filogenia e taxonomia de mixozoários parasitos de peixes provenientes de rios interiores do Estado de São Paulo*. Tese de pós graduação. 42pp. Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
80. fishbiosystem.ru/PERCIFORMES/SILLAGINIDAE/Sillago_sihama1.html