

Fabiola Santiago Pedrotti

**TOXICIDADE AGUDA DE AMÔNIA E NITRITO EM JUVENIS
DE ROBALO-FLECHA *Centropomus undecimalis*
(PERCIFORMES: CENTROPOMIDAE)**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de doutor em
aquicultura

Orientador: Vinicius Ronzani Cerqueira

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pedrotti, Fabiola Santiago

Toxicidade aguda de amônia e nitrito em juvenis
de robalo flecha *Centropomus undecimalis*
(perciformes: centropomidae) / Fabiola Santiago
Pedrotti ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira,
2018.

83 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Peixe marinho. 3. Nitrogênio.
I. Cerqueira, Vinicius Ronzani . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Aquicultura. III. Título.

**Toxicidade aguda de amônia e nitrito em juvenis de robalo flecha
Centropomus undecimalis (perciformes: centropomidae)**

Por

FABIOLA SANTIAGO PEDROTTI

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.



Profª. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

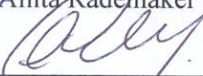
Banca Examinadora:



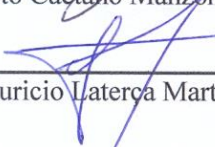
Dr. Vinicius Ronzani/Cerqueira – *Orientador*



Dra. Anita Rademaker Valença - UFSC



Dr. Gilberto Cactano Manzoni - UNIVALI



Dr. Mauricio Laterca Martins - UFSC

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram para que esta tese tenha sido possível.

Em especial, ao Vinícius Cerqueira pela orientação do trabalho, experiência na área piscicultura marinha e valiosos ensinamentos compartilhados.

Ao Manecas Baloi, pelas contribuições na concepção do projeto.

À toda equipe do LAPMAR, por tudo. E pela convivência diária e auxílio nas coletas.

Ao Maurício Laterça, pela disponibilidade e parceria, que desde a graduação tenho como mestre.

Ao Lucas e ao Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS/UFSC), pelas análises histológicas.

Ao Carlos Manoel do Espírito Santo, à Patrícia Melo e ao Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC), pelas análises de qualidade de água.

À Scheila Anelise Pereira, pelo programa Spearman LC₅₀.

Ao Carlito, pela dedicação e paciência comigo nestes anos.

RESUMO

O robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) tem grande potencial para a aquicultura. Considerando a existência de poucos estudos relacionados à exigência de parâmetros físico químicos da qualidade de água com larvas e juvenis desta espécie e visando a otimização do desempenho zootécnico, o presente estudo determinou sua tolerância à amônia e ao nitrito. Desta forma, foram conduzidos três experimentos para avaliar a toxicidade aguda de amônia não ionizada (NH_3) e de nitrito (NO_2), e para determinar a concentração letal média (CL_{50}) em 24, 48, 72 e 96 h de exposição a ambos os compostos. No primeiro experimento foi avaliada a tolerância de larvas de robalo-flecha expostas a concentrações crescentes de amônia não ionizada por 96 h. Dez larvas ($20,85 \pm 1,46$ mm) de 47 dias de idade por unidade experimental (1,5 L) foram submetidas por 96 h aos seguintes tratamentos em triplicatas: controle ($0,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$) e cinco concentrações crescentes de amônia ($0,65 \pm 0,04$; $1,29 \pm 0,09$; $2,59 \pm 0,18$; $3,88 \pm 0,27$; $5,17 \pm 0,34$ e $6,47 \pm 0,43 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$). Durante este período, não foram observadas mortalidades. Para o segundo experimento, utilizaram-se cinco juvenis ($20,35 \pm 6,10$ g; $13,90 \pm 1,75$ cm) por unidade experimental (60 L) expostos a concentrações de amônia não ionizada de $0,00 \pm 0,00$; $2,26 \pm 0,07$; $2,68 \pm 0,11$; $3,20 \pm 0,13$; $3,68 \pm 0,17$ e $4,27 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$. Após 96 h de exposição, amostras de brânquias e sangue foram coletadas para análise histológica e bioquímica, respectivamente. A mortalidade dos peixes aumentou à medida que as concentrações de amônia aumentaram, e a CL_{50} 96 h foi $3,52 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$. Os resultados demonstraram que as larvas são mais tolerantes que os juvenis, indicando que a toxicidade ambiental da amônia para o robalo-flecha é influenciada pela idade. A exposição subletal à amônia causou danos histológicos em brânquias de juvenis bem como variação nos níveis de glicose, hematócrito e contagem total de eritrócitos (RBC), demonstrando efeitos negativos sobre a homeostase dos peixes. No terceiro experimento avaliou-se a tolerância de juvenis de robalo-flecha à exposição aguda de nitrito em salinidade 30 g L^{-1} . Houve efeito letal nos peixes, aumento da toxicidade do nitrito ao longo do tempo de exposição e a CL_{50} 96 h foi $166,89 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_2$.

Palavras chave: Aquicultura. Peixe marinho. Nitrogênio.

ABSTRACT

The common snook (*Centropomus undecimalis*) has great potential for aquaculture. Considering the few studies related to water quality requirements and aiming at the reduction of zootechnical losses or even mortalities, the present study evaluated the tolerance of common snook to ammonia and nitrite. Thus, three experiments were conducted to determine the toxic effects and the lethal concentration (LC₅₀) at 24, 48, 72 and 96 h of exposure to both compounds. The first experiment evaluated larvae exposed to acute concentrations of non-ionized ammonia for 96 h in salinity 35 g L⁻¹, after 24 h of starvation. Ten larvae (20.85 ± 1.46 mm) of 47 days per experimental unit (1.5 L) were submitted for 96 h to the following triplicate treatments: control without ammonia (0.00 mg L⁻¹ NH₃) and five increasing concentrations of non-ionized ammonia (0.65 ± 0.04, 1.29 ± 0.09, 2.59 ± 0.18, 3.88 ± 0.27, 5.17 ± 0.34 and 6.47 ± 0.43 mg L⁻¹ NH₃). No mortalities were observed during this period. The second experiment was carried out with five juveniles (20.35 ± 6.10 g, 13.90 ± 1.75 cm) per experimental unit (60 L) exposed to a control without ammonia (0.00 mg L⁻¹ NH₃) and five increasing concentrations of non-ionized ammonia (2.26 ± 0.07, 2.68 ± 0.11, 3.20 ± 0.13, 3.68 ± 0.17 and 4.27 ± 0.16 mg L⁻¹). After 96 h, gills and blood were sampled to histological and biochemical analysis, respectively. Fish mortality increased as ammonia concentrations increased, and the LC₅₀ 96 h was 3.52 mg L⁻¹ NH₃. The larvae were less sensitive than juveniles, indicating that ammonia toxicity is influenced by age in common snook. In addition, sublethal exposition to ammonia causes histological damage in juvenile gills as well as variation in glucose, hematocrit and red blood cells (RBC), demonstrating negative effects on fish homeostasis. In the third experiment, tolerance of common snook juveniles was evaluated after acute exposition to nitrite in salinity 30 g L⁻¹. There was lethal effect on fish, increased nitrite toxicity over time, and LC₅₀ 96 h was 166.89 mg L⁻¹ NO₂.

Key words: Aquaculture. Marine fish. Nitrogen.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 - Excreção de amônia em brânquias de peixes..... 27

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Alterações histológicas em brânquias de juvenis de *Centropomus undecimalis* expostos a diferentes concentrações de amônia não ionizada (NH₃) por 96 h..... 49

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 - Principais espécies de peixes marinhos cultivados no mundo.....	21
Tabela 2 - Toxicidade de amônia para espécies peixes de água doce e marinhos.....	30
Tabela 3 –Toxicidade de nitrito para peixes marinhos.....	35

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Mortalidade (%) de juvenis de <i>Centropomus undecimalis</i> , concentração letal média (CL ₅₀ com intervalo de confiança de 95%) de amônia total nitrogenada (TAN) e amônia não ionizada (NH ₃) após exposição de 24, 48, 72 e 96 h (n=5).....	45
Tabela 2 - Parâmetros hematológicos (média+desvio padrão) de juvenis de <i>Centropomus undecimalis</i> expostos a diferentes concentrações de amônia não ionizada (NH ₃) por 96 h.....	47
Tabela 3 - Níveis de alterações histológicas em brânquias de juvenis de <i>Centropomus undecimalis</i> expostos a diferentes concentrações de amônia não ionizada (NH ₃) por 96 h.....	48

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Mortalidade (%) de juvenis de robalo-flecha <i>Centropomus undecimalis</i> expostos a diferentes concentrações de nitrito (NO ₂) e concentração média letal (CL ₅₀) em 24, 48, 72 e 96 h de NO ₂ (n=10)..	60
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	19
Espécie alvo	19
Piscicultura Marinha	20
Compostos nitrogenados	23
Amônia.....	24
Nitrito	31
1.1 Justificativa	36
1.2 OBJETIVOS	36
1.2.1 Objetivo geral	36
1.2.2 Objetivos específicos	36
Formatação dos artigos.....	37
2. CAPÍTULO 1	39
Mortalidade, hematologia e histopatologia de robalo-flecha <i>Centropomus undecimalis</i> (Perciformes: Centropomidae) exposto à toxicidade aguda de amônia	39
Resumo.....	39
Introdução	40
Material e Métodos.....	41
Resultados	44
Discussão.....	50
Conclusão	51
Referências.....	52
3. CAPÍTULO 2	57
Toxicidade aguda de nitrito em juvenis de robalo-flecha <i>Centropomus</i> <i>undecimalis</i> (Perciformes, Centropomidae)	57
Resumo.....	57
Introdução	58
Material e Métodos.....	58
Resultados	59
Discussão.....	59
Referências.....	62
4. CONCLUSÕES GERAIS	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

Espécie alvo

Pertencentes à família Centropomidae, robalos são encontrados em águas costeiras do sudeste dos EUA ao sul do Brasil, em regiões marinhas, estuarinas, lagunares e em rios próximos à costa (RIVAS, 1986; ALVAREZ-LAJONCHÈRE e TSUZUKI, 2008). No Brasil, dentre as várias espécies do gênero *Centropomus*, o robalo-flecha *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) e o robalo-peva *Centropomus parallelus* Poey, 1860 destacam-se nas pesquisas para cultivo (CERQUEIRA e TSUZUKI, 2009). A primeira, no entanto, tem preferência para empreendimentos comerciais por alcançar tamanhos maiores (CERQUEIRA et al., 2017).

O robalo-flecha é um peixe diádromo, estenotérmico, eurialino (HOWELLS et al., 1990) e protândrico hermafrodita, cujas fêmeas tornam-se sexualmente maduras entre 5 e 7 anos de idade (TAYLOR et al., 2000).

No que se refere à distribuição da espécie, a salinidade é um dos fatores mais importantes, devido à reprodução do peixe em águas oceânicas e a posterior migração dos juvenis para lagoas e estuários de baixa salinidade. Assim que atingem determinada idade, os juvenis retornam ao oceano para unirem-se aos demais reprodutores (GILMORE et al., 1983), fechando o ciclo de vida.

De hábito carnívoro, o robalo-flecha é considerado uma espécie marinha emergente para a piscicultura intensiva (CERQUEIRA et al., 2017). Apresenta alto valor de mercado, se adapta bem ao cativeiro, é eurialino, aceita com facilidade alimentos inertes com boa taxa de conversão alimentar (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; TUCKER, 2005; RHODY et al., 2014) e ainda tem importância para a pesca esportiva no continente americano (LOWERRE-BALBIERI et al., 2003).

Segundo Cerqueira et al. (2017), os estudos sobre reprodução controlada desta espécie no Brasil começaram a ter sucesso recentemente, utilizando-se reprodutores capturados na costa do litoral do Estado de Santa Catarina (PASSINI et al. 2016). Os indivíduos podem maturar em tanques circulares de 12.000 ou 36.000 L, em sistema de recirculação, numa densidade de 2,5 kg/m³ e proporção sexual de três machos para cada fêmea. Os reprodutores pesam cerca de 2,3 a 4,7 kg e de 3,6 a 9,4 para machos e fêmeas, respectivamente, e são alimentados com uma mistura de peixe, lula e camarão e ração em pó com 45% de proteína bruta (CERQUEIRA et al., 2017).

No entanto, apesar de promissores para a produção, o principal entrave para o cultivo em escala comercial consiste no insuficiente desenvolvimento da tecnologia de produção para juvenis de robalo (ALVAREZ-LAJONCHÈRE e TSUZUKI, 2008). Portanto, estudos básicos, como aqueles relativos à nutrição e à qualidade de água nesta fase de vida são fundamentais para colaborar com o desenvolvimento da piscicultura marinha.

Piscicultura Marinha

A aquicultura está entre as atividades de maior produção animal, contribuindo com quase metade da oferta de pescado (FAO, 2014). A redução dos estoques naturais e aumento da demanda do consumo por pescado é responsável pelo aumento da produção de peixe intensiva (YOGEV, 2017). Apesar do potencial, a piscicultura marinha contabiliza apenas 3,2% da aquicultura mundial (FAO, 2006) e é essencial para reduzir a pressão de captura nos estoques marinhos (TAL et al., 2006).

Considerando o cultivo de peixes diádromos destacam-se os salmonídeos, peixe leite e robalo asiático (Tabela 1). Dentre as espécies exclusivamente marinhas estão o olhete, pargo japonês e europeu, tainha, linguado japonês e europeu, robalo europeu e garoupas (CERQUEIRA, 2004).

No Brasil, o cultivo de peixes marinhos provavelmente teve início no século XVII no Estado de Pernambuco, com sistemas extensivos de cultivo de robalos (*Centropomus*), tainhas (*Mugil*) e carapebas (*Eugerres* e *Diapterus*) em viveiros de maré (CAVALLI e HAMILTON, 2009).

No entanto, a piscicultura marinha no país contribui insignificamente na produção mundial, com poucas tentativas de cultivo em escala comercial. Apesar das favoráveis condições naturais, recursos hídricos e presença de peixes marinhos com potencial para a aquicultura, a atividade está praticamente limitada às iniciativas das instituições de pesquisa (ROUBACH et al., 2003; MYHRE et al., 2017).

Conforme revisado por Cerqueira et al. (2017), estudos sobre reprodução controlada e larvicultura em laboratório de peixes marinhos brasileiros começaram com tainha *Mugil liza* em 1979 no Rio de Janeiro (BENETTI e FAGUNDES NETTO, 1980), após em Santa Catarina (ANDREATTA et al., 1981) e São Paulo (GODINHO et al., 1993).

Tabela 1 - Principais espécies de peixes marinhos cultivados no mundo.

Famílias	Espécies	Nome comum	Países
Peixes diádromos			
<i>Chanidae</i>	<i>Chanos chanos</i>	Peixe leite	Filipinas, Indonésia
<i>Salmonidae</i>	<i>Salmo salar</i>	Salmão Atlântico	Noruega, Escócia, Chile
	<i>Onchorhynchus</i>	Salmão Pacífico	Japão, Chile, Canadá
<i>Centropomidae</i>	<i>Lates calcarifer</i>	Robalo Asiático	Malásia, Indonésia
Peixes marinhos			
<i>Carangidae</i>	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Olhete	Japão
<i>Sparidae</i>	<i>Pagrus major</i>	Pargo japonês	Japão
	<i>Sparus auratus</i>	Pargo europeu	Grécia, Espanha, Itália, Turquia, Egito
<i>Mugilidae</i>	<i>Mugil cephalus</i>	Tainha	Egito, Itália, Israel
	<i>Mugil spp</i>	Tainha	Indonésia, Itália
<i>Paralichthyidae</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Linguado Japonês	Japão, Coreia
<i>Scophthalmidae</i>	<i>Psetta máxima</i>	Linguado europeu	Espanha, França
<i>Serranidae</i>	<i>Dicentrachus labrax</i>	Robalo europeu	Itália, Grécia, Egito
	<i>Epinephelus spp</i>	Garoupas	Tailândia, Malásia

Fonte: Cerqueira (2004)

Entretanto, não houve continuidade para o estabelecimento da criação comercial da espécie, já que o interesse do setor produtivo foi maior no desenvolvimento da carcinicultura marinha, com ciclo de produção mais curto e rentável (CERQUEIRA et al., 2017).

Na década de 1990, peixe-rei marinho *Odonthestes argentinensis*, robalo-peva *Centropomus parallelus* e linguado *Paralichthys orbignyana* começaram a ser estudados (CERQUEIRA, 2004) mas tampouco passaram à escala comercial (CERQUEIRA et al., 2017). A partir de 2000, novas espécies tornaram-se interesse de pesquisadores brasileiros (CAVALLI e HAMILTON, 2009), com prioridade para peixes carnívoros com alto valor de mercado, como ariocó *Lutjanus synagris*, carapeva *Eugerres brasilianus* e cioba *Lutjanus analis* (CERQUEIRA et al., 2017).

O conhecimento mais aprofundado sobre o manejo de reprodutores e o controle da reprodução de espécies marinhas é mais recente que o de espécies água doce (CERQUEIRA, 2004). Segundo Cerqueira et al. (2017), as estratégias reprodutivas são muito variadas entre as numerosas espécies utilizadas na piscicultura marinha, o que implica em conhecimento e sistema de produção específicos.

Porém, é possível observar características comuns na estratégia reprodutiva da maioria das espécies de peixes marinhos cultivadas, como bissexualidade, ausência de dimorfismo sexual, desovas parciais em ambiente marinho, ovos livres e planctônicos, alta fecundidade, período curto de embriogênese, bem como larvas planctônicas pequenas e frágeis (CERQUEIRA et al., 2017).

Muitos avanços foram obtidos nas últimas décadas em diversas partes do mundo, possibilitando a criação comercial de um número considerável de espécies (CERQUEIRA et al., 2017). Mesmo que em maioria provenientes de clima temperado, como robalo e pargo europeu (Carrillo, 2009), algum esforço envolveu peixes tropicais, inclusive presentes nas águas brasileiras, como bijupirá, robalo e groupa.

Conforme Cerqueira et al. (2017), o conhecimento vindo de fora do Brasil tem sido muito valioso para o estudo de nossas espécies, como o manejo de reprodutores (BROMAGE e ROBERTS, 1995; MYLONAS et al., 2010) e terapias hormonais mais eficientes (MAÑANOS et al., 2008; MYLONAS et al., 2010), que possibilitam estudos sobre a criação das larvas.

Além do controle da reprodução, outro aspecto importante e complexo da piscicultura envolve a manutenção da qualidade da água em condições adequadas para criação dos organismos aquáticos, exigindo manejo efetivo e assegurando sustentabilidade (SOUSA et al., 2016).

Da mesma forma, para a expansão da produção de peixes marinhos, a redução do risco de impacto ambiental gerado é essencial (TAL et al., 2006). Segundo Boyd (2003), impactos ambientais da aquicultura podem incluir destruição de ecossistemas alagados, surto de enfermidades, redução da biodiversidade de populações naturais, bem como a poluição do solo e água pelo efluente produzido.

Os principais obstáculos para o aumento da aquicultura marinha ecologicamente sustentável estão relacionados a: interação com o ambiente - incluindo os sistemas de cultivo, além da dependência de óleo e farinha de peixe na dieta dos organismos (TAL et al., 2006).

Em resposta à crescente demanda por produtos da aquicultura e restrições referentes a limite de matéria orgânica e nitrogênio no efluente, os chamados “sistemas de recirculação em aquicultura” (RAS) têm sido desenvolvidos como alternativas sustentáveis à aquicultura tradicional, devido ao baixo impacto e amplo controle operacional (YOGEV et al., 2017).

Nos sistemas de criação de peixes, a qualidade da água está relacionada com a água de origem, manejo, espécies cultivadas, quantidade e composição do alimento fornecido (SOUSA et al, 2016).

A ração ofertada é a única entrada de nitrogênio do sistema de recirculação. De acordo com Lovell (1988), a ração para peixe contém cerca de 25 a 65 % de proteína, correspondendo a 4,1 a 10,7 % de nitrogênio. Apenas 20 a 30 % do nitrogênio é retido pelos peixes, sendo que o restante é excretado. Do nitrogênio excretado, significativa parcela é composta por amônia total nitrogenada (TAN), que é tóxica para muitos peixes mesmo em baixas concentrações (YOGEV et al., 2017).

Neste sentido, um tratamento comum para reduzir a amônia da água é o processo de nitrificação aeróbica, que a transforma em nitrato (GUERDAT et al., 2010). Após, a água pode ser renovada ou passar por processo de desnitrificação, que reduz o nitrato em gás nitrogênio em condições anaeróbicas por bactérias heterotróficas (YOGEV et al., 2017).

Compostos nitrogenados

O nitrogênio é considerado um dos elementos mais importantes no metabolismo de ecossistemas aquáticos por participar da formação de proteínas, atuar como fator limitante da produção primária ou tornar-se tóxico para os organismos aquáticos (PEREIRA e MERCANTE, 2005). No ambiente aquático, o nitrogênio pode ser encontrado sob diferentes formas, como nitrito, nitrato, amônia, óxido nitroso e amoníaco

(SIPAÚBATAVARES, 1998), sendo que em sistemas de cultivo, amônia e nitrito são os poluentes mais comuns (LEWIS e MORRIS, 1986).

No contexto da aquicultura, principalmente em cultivos de peixes carnívoros, a ração ofertada possui alto valor proteico (BUDDINGTON et al., 1997). Todavia, a proteína, quando não aproveitada para crescimento, é eliminada na forma de fezes ou excretada como amônia e ureia pelos animais (BALDISSEROTTO, 2002). Em geral, cerca de 40 a 60% da ingestão de nitrogênio pela alimentação são excretados pelos peixes em 24h (LIM et al., 2004), o que aumenta a concentração de compostos nitrogenados na água.

Diferentemente de carboidratos e lipídios, que, em excesso, são transformados em glicogênio e triglicerídios, os aminoácidos não são armazenados. Tal fato ocorre porque o nitrogênio é muito tóxico para ser estocado nos tecidos, como quando se encontra na forma de amônia, e apresenta demanda energética muito alta para ser convertido em formas menos tóxicas, como ácido úrico ou ureia (EVANS et al., 2005).

A tolerância dos peixes aos compostos nitrogenados pode ser em relação à exposição aguda ou crônica (RANDALL e TSUI, 2002; TOMASSO e GROSSEL, 2005). A exposição em níveis agudos pode causar a letalidade dos peixes, enquanto que em níveis crônicos, podem apresentar redução subletal de crescimento ou supressão do sistema imunológico (HARGREAVES, 1998).

Amônia

Em meio aquático, a formação de amônia é por decomposição aeróbia e anaeróbia da matéria orgânica (ESTEVES, 1998). Após a oxidação biológica, um processo conhecido como nitrificação transforma a amônia em nitrito, e posteriormente, nitrito em nitrato (OLIVEIRA et. al., 2006), por bactérias nitrificantes *Nitrossomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente, na presença de oxigênio. Por outro lado, a desnitrificação, que é a redução do nitrato a íon amônio, ocorre em condições anaeróbias (ESTEVES, 1998).

A toxicidade da amônia ambiental é expressa como amônia total, que é composta pela amônia gasosa ou porção não ionizada (NH_3) e pelo íon amônio ou porção ionizada (NH_4^+) (ARANA, 2004). O pH, e em menor nível, a temperatura da água determinam a proporção de NH_4^+ e NH_3 (IP e CHEW, 2010). A concentração de NH_3 pode aumentar em dez vezes a cada unidade de pH que aumenta (MEADE, 1989). A amônia não ionizada apresenta maior toxicidade por difundir mais facilmente pelas

membranas biológicas de animais aquáticos que a forma ionizada (EVANS et al., 2005).

A influência da temperatura na toxicidade de amônia é menor entre 3 e 30°C em sistemas de água doce (USEPA, 1998), mas pouco se sabe sobre esse efeito em sistemas de água marinha. De acordo com dados da USEPA (1984 e 1989), em geral espécies marinhas são mais sensíveis aos efeitos da amônia que as de água doce.

Contudo, diferenças entre espécies em cada ambiente são muito mais significantes que as relacionadas à salinidade, no que diz respeito à toxicidade de amônia (RANDALL e TSUI, 2002).

Em sistemas intensivos, a amônia é um dos produtos mais tóxicos resultantes da excreção dos animais cultivados e da mineralização dos detritos orgânicos, como ração não consumida e fezes (LIN e CHEN, 2003). O acúmulo de amônia pode deteriorar a qualidade da água, reduzir o crescimento e a taxa de excreção de amônia, elevar o consumo de oxigênio, alterar as concentrações de aminoácidos e até causar mortalidades (ARANA, 2000).

Nos peixes, a síntese de amônia ocorre principalmente no fígado, mas também no tecido muscular esquelético, rins e brânquias (WOOD, 1993). Já a excreção de amônia e ureia ocorre primeiramente nas brânquias, pelas mesmas razões de serem as principais responsáveis por trocas gasosas e equilíbrio iônico: grande área de superfície, curtas distâncias de difusão, altas taxas de ventilação e contato com a mucosa (EVANS et al., 2005). O esquema de excreção de amônia está representado na figura 1 (EVANS et al., 2005 adaptado de WILKE, 1997).

Apesar de os mecanismos específicos de toxicidade de amônia total não serem completamente elucidados em peixes, sabe-se que altas concentrações são incompatíveis com muitas funções dos tecidos (CAMPBELL, 1991). Os principais efeitos agudos da amônia estão relacionados com a capacidade da forma iônica substituir o íon potássio no transporte de íons e desequilibrar, por exemplo, os gradientes eletroquímicos no sistema nervoso central (COOPER e PLUM, 1987).

De forma geral, são observados efeitos morfológicos (em tecidos), comportamentais e fisiológicos (em parâmetros bioquímicos) de peixes expostos a amônia ambiental, descritos a seguir.

Elevadas concentrações de amônia ambiental podem reduzir sua excreção ou provocar sua absorção pelos peixes. Por consequência, ocorre o aumento das concentrações internas de amônia, causando até convulsões e mortalidades. Enquanto algumas espécies de peixes não suportam grandes concentrações de amônia interna, outras podem ser mais

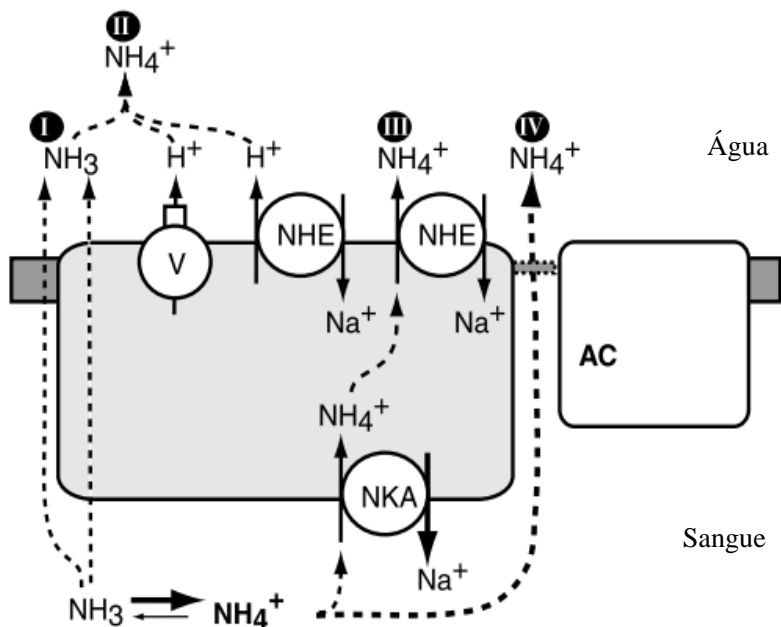
tolerantes por desenvolverem estratégias para a redução da toxicidade, como manter a excreção de amônia (RANDALL et al., 1999) ou convertê-la para substâncias menos tóxicas (PENG et al., 1998). Elevadas concentrações de amônia ambiental podem reduzir sua excreção ou provocar sua absorção pelos peixes. Por consequência, ocorre o aumento das concentrações internas de amônia, causando até convulsões e mortalidades. Enquanto algumas espécies de peixes não suportam grandes concentrações de amônia interna, outras podem ser mais tolerantes por desenvolverem estratégias para a redução da toxicidade, como manter a excreção de amônia (RANDALL et al., 1999) ou convertê-la para substâncias menos tóxicas (PENG et al., 1998).

A amônia ambiental pode causar efeitos deletérios nas brânquias dos peixes, por favorecer a produção de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo nos tecidos (CHING et al., 2009). Danos nestes órgãos prejudicam também o transporte iônico branquial não associado com o acúmulo de amônia endógena, já que as brânquias apresentam uma pré-disposição a alterações histopatológicas (DAOUST e FERGUSON, 1984; IP e CHEW, 2010). Além disso, os distúrbios na integridade epitelial têm consequências adversas ainda em outros processos celulares, bem como na proliferação de muco nas brânquias, que aumenta a distância de difusão das lamelas (FERGUSON et al. 1992).

Danos branquiais devido à toxicidade de amônia são característicos (MARTINEZ et al., 2006). Após a exposição de amônia por 24 h, peixes neotropicais apresentaram hiperplasia das células do filamento e lamelas, além de telangectasia e dilatação dos canais sanguíneos (MARTINEZ et al., 2006). Em carpas comuns, observou-se elevação epitelial e hemorragia nas brânquias (PEYHAN e TAKAMI, 2002). Em tilápia houve hiperplasia do epitélio branquial e fusão das lamelas (BENLÌ e KÖKSAL, 2005). As alterações histológicas branquiais podem afetar diretamente mecanismos de respiração e osmorregulação, causando hipóxia e distúrbios osmóticos (PEYHAN e TAKAMI, 2002).

Alterações branquiais são consideradas mecanismo de defesa para combater diversos estressores em peixes (FERGUSON et al., 1990). Estratégia de adaptação às condições desfavoráveis e constantes, o inchaço das lamelas aumenta a distância de difusão entre o ambiente e o sangue, minimizando o efeito de um ambiente adverso (FERNANDES e MAZON, 2003).

Figura 1 - Excreção de amônia em brânquias de peixes.



Nas brânquias de peixes, podem ocorrer distintas vias de excreção de amônia, que estão enumeradas em ordem de ocorrência:

I - Difusão de NH_3 por ou entre células epiteliais para gradientes de difusão sangue/água desfavoráveis.

II - Difusão de NH_3 dependente da secreção de prótons para prender amônia como NH_4^+ .

III - Transporte de amônia através do trocador de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHE) e / ou de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$.

IV - Difusão de NH_4^+ pelas junções entre células de cloreto e células acessórias (AC) em teleósteos marinhos.

A via I pode ocorrer em qualquer tipo de célula, as vias II e III só podem ocorrer na secreção ácida das células e a via IV só pode ocorrer nas células de cloreto de teleósteos.

Fonte: EVANS et al. (2005), adaptado de WILKE (1997).

Segundo Hinton et al. (1992), elevação epitelial e hiperplasia são alterações reversíveis e inespecíficas que podem servir como defesa do peixe, devido ao aumento da distância de difusão entre água e sangue. Interferem, contudo, na eficiência das trocas gasosas e transporte iônico (MARTINEZ et al., 2006). Entretanto, telangiectasia e rompimento das células pilares são alterações mais graves e geralmente irreversíveis (HINTON et al., 1992).

De fato, Knoph e Thorud (1996) observaram que a morte de peixes por intoxicação de amônia foi precedida por sintomas como hiperventilação, seguida de ventilação esporádica, perda de equilíbrio, natação espiral e convulsões. Durante a exposição aguda de amônia, Baloi et al. (2017) relataram redução da atividade natatória com o aumento das concentrações de amônia e tempo de exposição. Pode haver também distúrbio no sistema nervoso, aumento da ventilação branquial, perda de equilíbrio, convulsões e altas mortalidades (FOSS et al., 2003; WANG et al. 2015).

De acordo com Lamarié et al. (2006), os efeitos são imediatos e proporcionais à concentração, podendo ser observados após 15 minutos com dificuldades de natação e aumento do consumo de oxigênio. Quando a amônia endógena ou exógena entra no sistema sanguíneo, o efeito tóxico ocorre em todas as células, especialmente no coração e cérebro (COOPER e PLUM, 1987).

A amônia como agente estressor pode gerar uma série de respostas endócrinas nos peixes, via eixo hipotálamo-hipófise e células inter-renais, ou via resposta adrenérgica, que estimula a secreção de catecolaminas plasmáticas (BROWN, 2012). O estresse pode ser avaliado por meio da análise dos parâmetros de glicose plasmática, hematócrito, número de eritrócitos, entre outros (BARTON e IWAMA, 1991; MARTINEZ et al., 2006).

Sabe-se que o estresse induz a liberação de catecolaminas, causando a elevação do hematócrito por incremento da hemoglobina, volume e número de eritrócitos, conforme sugerem Mariano et al. (2009). Podem ainda aumentar a perfusão branquial, perda de íons por difusão para o meio externo e consequente desequilíbrio iônico (NOLAN, 2000).

A fim de mobilizar reservas energéticas, os efeitos metabólicos do estresse em peixes, além de hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio e lipólise, ainda podem incluir a inibição da síntese proteica (WENDELAAR BONGA, 1997). Conforme relatado por McCormick et al. (2003), a concentração de glicose sanguínea de peixes é utilizada como um dos principais indicadores de estresse, sendo que

aqueles mais estressados apresentam índices elevados por mais tempo, cujos valores podem variar segundo os agentes estressantes administrados.

No entanto, espécies de peixes expostos a níveis subletais de amônia apresentam padrões muito distintos no que se refere à taxa de glicemia sanguínea, podendo apresentar respostas hiperglicêmicas mais duradouras, mais transitórias ou mesmo não apresentar alterações (MARTINEZ et al., 2006).

A amônia pode interferir no balanço iônico intracelular e do organismo, que é afetado pela redução do fluxo Na^+ e K^+ devido à substituição do NH_4^+ na relação Na^+ / K^+ ATPase e/ou no co-transporte de $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ (WILKIE, 2002). Em peixes marinhos, os processos celulares afetados pela amônia incluem ainda a possibilidade da porção ionizada NH_4^+ substituir o H^+ no fluxo de Na^+/H^+ (RANDALL et al., 1999).

Em condições experimentais, a toxicidade de amônia em peixes juvenis e larvas foi estudada em diversas espécies, conforme demonstra a Tabela 1. Estudos também observaram redução de resistência à amônia conforme a idade para algumas espécies de peixe (MARTINEZ et al., 2006). A LC_{50} 48 h variou de 1,72; 0,69 e 0,32 mg L^{-1} para larvas de *Gadus macrocephalus* com 4,63±0,14; 5,83±0,17 e 7,46±0,23 mm (WANG et al., 2015). Da mesma forma, larvas de *Opsanus beta* foram mais tolerantes que juvenis e adultos (BARIMO e WALSH, 2005), assim como juvenis de *Notropis topeka* quando comparados a adultos (ADELMAN et al., 2009).

Além das diferenças entre fases de desenvolvimento, espécies de peixes respondem de formas distintas à concentração de amônia (FOSS et al., 2003). Uma vez que depende das condições ambientais e das características biológicas do peixe, a tolerância à amônia entre espécies é difícil de ser comparada (COSTA et al., 2008).

Observando variação do efeito da amônia sobre o balanço de sódio e no hematócrito entre peixes neotropicais, Martinez et al. (2006) atribuíram a menor sensibilidade de algumas espécies ao menor acúmulo de amônia no plasma, resultado de uma maior taxa de excreção de amônia ou menor permeabilidade branquial à NH_3 .

Tabela 2 - Toxicidade de amônia para espécies peixes de água doce e marinhos.

Nome comum	Espécie	Fase	CL ₅₀ NH ₃ (mg L ⁻¹)	Salinidade	Autores
	Média para espécies de água doce		0,82 96h	0	PERSON-LE et al., 1995
Pacu	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	juvenil	0,85 24h	0	
Curimba	<i>Prochilodus lineatus</i>	juvenil	0,74 24h	0	MARTINEZ et al., 2006
Lambari	<i>Astyanax altiparanae</i>	juvenil	0,66 24h	0	
Bagre do canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	juvenil	2,36 24h	0	
Tilápia azul	<i>Oreochromis aureus</i>	juvenil	2,46 24h	0	
Robalo riscado	híbrido de <i>Morone saxatilis</i> e <i>M. chrysops</i>	juvenil	0,64 96h	marinha	HARGREAVES e KUCUK, 2001
Sardinha verdadeira	<i>Sardinella brasiliensis</i>	juvenil	0,74 96h	marinha	BALOI et al., 2017
Pampo	<i>Trachinotus marginatus</i>	juvenil	1,06 96h	marinha	COSTA et al., 2008
Tainha	<i>Mugil platanus</i>	juvenil	0,84 96h	marinha	SAMPAIO et al., 2002
Peixe palhaço	<i>Premnas biaculeatus</i>	juvenil	0,89 96h	marinha	RODRIGUES et al., 2014
Bijupirá	<i>Rachycentron canadum</i>	juvenil	1,13 96h	marinha	RODRIGUES et al., 2007
Robalo europeu	<i>Dicentrarchus labrax</i>	juvenil	1,60 96h	marinha	
Dourada	<i>Sparus aurata</i>	juvenil	2,70 96h	marinha	PERSON-LE et al., 1995
Linguado	<i>Scophthalmus maximus</i>	juvenil	3,00 96h	marinha	
Black bass marinho	<i>Centropristis striata</i>	juvenil	0,50 96h	marinha	WEIRICH e RICHE, 2006
Bacalhau do Pacífico	<i>Gadus macrocephalus</i>	larva 4,63g	2,88 24h		
		larva 5,83g	0,88 24h	marinha	WANG et al., 2015
		larva 7,46g	0,38 24h		

Nitrito

O nitrito, por sua vez, é um produto intermediário na nitrificação bacteriana e apresenta, em geral, baixas concentrações no sistema de cultivo (SVOBODOVÁ et al., 2005). Está presente no meio aquático na forma de ácido nítrico ou nitrito ionizado, cuja proporção é determinada pelo pH: quanto mais alto, maior a concentração de nitrito.

Geralmente, a concentração de nitrito na água é baixa (KROUPOVA et al., 2005) mas pode atingir altos níveis no cultivo intensivo de peixes, como em sistemas de recirculação (RAS) (DOLEŽELOVÁ et al., 2011).

Se o processo de oxidação for incompleto, altas concentrações de nitrito podem afetar a qualidade de água, reduzir o crescimento dos peixes, prejudicar sua excreção de amônia e causar mortalidades (KROUPOVA et al., 2005). Conforme indicam estudos de toxicidade e efeitos fisiológicos, a exposição de nitrito ambiental pode ser extremamente tóxica para muitos organismos aquáticos (RUSSO, 2006).

Altas concentrações de nitrito causam problemas severos em cultivos intensivos de espécies comerciais de peixes (SVOBODOVÁ et al., 2005). Os processos de absorção, mecanismo de toxicidade e efeitos fisiológicos de nitrito foram descritos detalhadamente por JENSEN (2003) e KROUPOVA et al. (2005). O nitrito absorvido pelas brânquias e epitélio intestinal se acumula no plasma, brânquias, fígado, cérebro, baço, músculo e outros tecidos, semelhante à bioacumulação de um poluente (PARK et al., 2007).

Em peixes, a exposição de nitrito pode prejudicar múltiplas funções fisiológicas como regulação iônica, respiração e processos cardiovasculares, endócrinos e de excreção (KROUPOVÁ et al., 2005).

Disfunções induzidas por nitrito incluem anemia (PARK et al., 2007), redução da concentração de hemoglobina e conseqüente aumento de metahemoglobina (JIA et al., 2015), redução de parâmetros hematológicos (MADISON e WANG, 2006); aumento da concentração de triglicérides (JIA et al., 2015); redução da proteína sérica (PARK et al., 2007); alterações no balanço ácido-base e na homeostase iônica (WOO e CHIU, 1997; JIA et al., 2015).

Efeitos letais e subletais podem estar relacionados a metahemoglobina, resultante da oxidação da hemoglobina, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio no sangue (CAMERON, 1971). Assim, é possível haver morte por asfixia mesmo em ambientes com altas concentrações de oxigênio dissolvido (JENSEN, 2003).

Apesar da presença da metahemoglobina não estar diretamente ligada às mortalidades (COSTA et al., 2004), a entrada de nitrito na corrente sanguínea pode causar um aumento da lise das células sanguíneas (KNUDSEN e JESEN, 1997), alterações no balanço eletrolítico plasmático (HUERTAS et al., 2002) e um efluxo de íons potássio dos eritrócitos, os quais reduzem de volume (MARTINEZ e SOUZA, 2002). A redução na contagem total de eritrócitos pode ocorrer devido à retirada de eritrócitos não funcionais da circulação sanguínea, conforme observado por Park et al. (2007) em *Sebastes inermis*.

Em exposições agudas de nitrito, o aumento da metahemoglobina causa a redução de hemoglobina, em intensidade proporcional às concentrações de nitrito (JENSEN, 2003; PARK et al., 2007). Tal processo pode ser explicado pela exaustão da hematopoese e redução da síntese de hemoglobina em condições hipóxicas (SAWHNEY e JOHAL, 2000), gerando hipóxia dos tecidos (TOMASSO, 1994).

A hipóxia dos tecidos e alterações do metabolismo aeróbico para anaeróbio exige maior gasto energético, provocando a redução dos níveis de glicose sanguínea, no início da exposição ao nitrito (DAS et al., 2004; PARK et al., 2007). Após 96 h, porém, os níveis aumentam, possivelmente devido às alterações no metabolismo celular (PARK et al., 2007).

Sabe-se que, quando peixes são expostos a agentes tóxicos estressantes, maior demanda energética é necessária para a manutenção do metabolismo (PARK et al., 2007). Por conseguinte, ocorre o aumento do catabolismo de proteínas para a obtenção de energia, reduzindo a proteína sérica sanguínea (DAS et al., 2004).

Assim, índices bioquímicos do plasma sanguíneo, como glicose, proteínas totais, albuminas, globulinas totais, amônia, triacilglicerídeos, cálcio, fósforo inorgânico e atividade enzimática da desidrogenase láctica podem ser avaliados em estudos de toxicidade aguda de nitrito (SVOBODOVÁ et al., 2005).

Com a exposição de peixes ao nitrito, além do decréscimo dos níveis de hemoglobina e aumento dos níveis de metahemoglobina, observa-se redução do hematócrito, contagem de eritrócitos, leucócitos e linfócitos. Também podem ocorrer alterações qualitativas em eritrócitos, como alongamento do formato da célula, deslocamento do núcleo para um dos polos celulares e descoloração do citoplasma. Tal descoloração pode ser explicada em razão da redução da concentração de hemoglobina dos peixes expostos (SVOBODOVÁ et al., 2005).

Estresses agudos podem causar alterações nas contagens de leucócitos, já que leucopenia, linfócitopenia e neutrofilopenia podem ser

desencadeadas como resposta a impactos ambientais (NOGA, 2000). A redução de leucócitos e linfócitos em carpas indica supressão do sistema imunológico não específico. Provavelmente, o estresse prolongado reduz a leucopoese, e consequente diminuição da contagem de leucócitos (DAS et al., 2004; SVOBODOVÁ et al., 2005).

Estudos histopatológicos de peixes expostos a poluentes revelaram que seus órgãos são indicadores eficientes de qualidade de água (CENGIZ et al., 2001). Desta forma, com a exposição de peixes ao nitrito, tecidos da derme, brânquias, fígado e rim podem apresentar danos citológicos e histológicos (FRANCES et al., 1998; PARK et al., 2007).

Em carpa comum (*Cyprinus carpio*) exposta ao nitrito, as principais lesões histológicas foram encontradas nos tecidos das brânquias, como hiperplasia e elevado número de células de cloreto (SVOBODOVÁ et al., 2005). As brânquias são importantes órgãos para a respiração, regulação osmótica, balanço ácido/básico e excreção de nitrogênio (HEATH, 1987), sendo que os peixes absorvem íons de nitrito através de um mecanismo de transporte ativo associado com as células de cloreto das brânquias (LEWIS e MORRIS, 1986).

Em peixes, a toxicidade de nitrito varia consideravelmente e depende de muitos fatores externos e internos, como pH, temperatura, concentrações iônicas e oxigênio dissolvido da água; duração da exposição; espécie, tamanho e idade do peixe, além da concentração de cloreto (KROUPOVÁ et al., 2005).

Como o nitrito e cloretos são concorrentes na passagem pelas brânquias e epitélio intestinal (TOMASSO, 1994), a presença de cloretos e outros ânions na água proporciona uma ação protetora contra a absorção ativa de nitrito (STORMER et al., 1996).

Portanto, a toxicidade do nitrito para peixes está principalmente relacionada à concentração de íons e substâncias dissolvidos, como brometo, sulfato, fosfato, nitrato, azul de metileno, ácido ascórbico e ácido úrico. Estudos observaram que a toxicidade pode ser inversamente proporcional à concentração de íons de cálcio (CRAWFORD e ALLEN, 1977) e cloreto (TOMASSO, 1986).

Contudo, no ambiente, o cloreto em forma de sal tem pouca influência sobre a sobrevivência ou utilização de nitrito pelo linguado (*Paralichthys lethostigma*), de acordo com Atwood et al. (2001). Concentrações séricas de cloreto, por sua vez, sendo mais altas em peixes marinhos, podem explicar a maior tolerância ao nitrito quando comparados aos peixes de água doce (FOLMAR et al., 1993).

A maior toxicidade do nitrito em água doce também foi observada por Crawford e Allen (1977) em salmão rei (*Oncorhynchus*

tshawytscha), Sampaio et al. (2002) em tainha (*Mugil platanus*), Saroglia et al. (1981) em enguia europeia (*Anguilla anguilla*) e Wise e Tomasso (1989) em *Sciaenops ocellatus*.

Em peixes marinhos, a toxicidade de nitrito em juvenis e larvas foi estudada com diversas espécies, conforme demonstra a Tabela 2.

Da mesma forma, pode haver variação na toxicidade do nitrito pelo tamanho do peixe, conforme observaram Alcaraz e Espina (1995) com juvenis de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), Almendras (1987) com juvenis de peixe leite (*Chanos chanos*) e Atwood et al. (2001) com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Por outro lado, não foram observadas diferenças na toxicidade entre bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) de 3 e 80,2g nem entre black bass (*Micropterus salmoides*) de 2,8 g e 36,3 g (PALACHEK E TOMASSO, 1984; TOMASSO, 1986).

Afetam a toxicidade de nitrito, ainda, os parâmetros físico-químicos de qualidade de água. O equilíbrio do nitrito dissolvido depende do pH do sistema, que determina as proporções de nitrito ionizado (NO_2^-) e não ionizado (HNO_2). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), por exemplo, demonstrou-se que a toxicidade de nitrito total reduz conforme o pH aumenta. Com o aumento do pH, a toxicidade de nitrito ionizado decresce e a de não ionizado aumenta (RUSSO et al., 1981).

As concentrações de oxigênio dissolvido também influenciam a toxicidade. Segundo Browser et al. (1983), na presença de nitrito, concentrações de 5 mg L^{-1} de oxigênio dissolvido foram insuficientes para evitar mortalidades de bagre de canal (*I. punctatus*), enquanto a espécie normalmente suporta concentrações mais baixas. Observou-se que em temperaturas acima ou abaixo daquelas ideais para espécie, a toxicidade do nitrito é mais alta devido ao menor conforto térmico dos animais, conforme indicaram Alcaraz e Espina (1995) em estudos com carpa capim (*C. idella*).

Tabela 3 – Toxicidade de nitrito para peixes marinhos.

Nome comum	Espécie	fase	Nitrito (NO ₂)	Autores
Linguado	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	juvenil	30 mg L ⁻¹ LC ₅₀ 96 h NO ₂	BIANCHINI et al., 1996
Peixe leite	<i>Chanos chanos</i>	juvenil	675 mg L ⁻¹ LC ₅₀ 96 h NO ₂	ALMENDRAS, 1987
Red drum	<i>Sciaenops ocellatus</i>	larva	85 mg L ⁻¹ LC ₅₀ 96 h NO ₂	WISE e TOMASSO, 1989
Peixe rei	<i>Odontesthes argentinensis</i>	larva	199 mg L ⁻¹ LC ₅₀ 96 h NO ₂	SAMPAIO et al., 2006
Bijupirá	<i>Rachycentron canadum</i>	juvenil	210 mg L ⁻¹ LC ₃₀ 24 h NO ₂	RODRIGUES et al., 2007
Dourada	<i>Sparus aurata</i>	larva	1997 mg L ⁻¹ LC ₅₀ 24 h NO ₂	PARRA e YUFERA, 1999
Linguado	<i>Solea senegalensis</i>	larva	>2000 mg L ⁻¹ - sem mortalidade	
-	<i>Heteromyceteris capensis</i>	larva	2440 mg L ⁻¹ CL ₅₀ 24 h NO ₂	BRONWELL, 1980
-	<i>Synaptura kleini</i>		2110 mg L ⁻¹ CL ₅₀ 24 h NO ₂	
-	<i>Gaidropsarus capensis</i>		2210 mg L ⁻¹ CL ₅₀ 24 h NO ₂	
Sargo	<i>Diplodus sargus</i>	1360 mg L ⁻¹ CL ₅₀ 24 h NO ₂		
Ferreira	<i>Lithognathus mormyrus</i>	1230 mg L ⁻¹ CL ₅₀ 24 h NO ₂		

1.1 JUSTIFICATIVA

O acúmulo de amônia e nitrito pode ser prejudicial aos peixes, além de causar a eutrofização da água, do solo e degradar ecossistemas aquáticos (HOWARTH et al., 2000). Na aquicultura, o potencial aumento das concentrações de compostos nitrogenados no ambiente é um problema inerente aos cultivos em sistema com recirculação de água ou com baixa renovação (WEIRICH e RICHE, 2006).

Uma vez que podem atingir níveis tóxicos para os organismos aquáticos cultivados, cuidados quanto ao acúmulo de amônia e nitrito devem ser considerados em sistemas intensivos de produção (TOMASSO, 1994).

Neste contexto, considerando que o robalo-flecha é promissor na atividade de piscicultura, estudos que colaborem com o cultivo em sistemas de recirculação de água são cada vez mais necessários.

Além disso, como a espécie possui hábito alimentar carnívoro, com alta demanda proteica, há maior excreção de compostos nitrogenados no ambiente aquático. No entanto, existem poucos estudos sobre a exigência e efeitos de parâmetros qualidade de água inadequados no cultivo do robalo-flecha, principalmente em relação aos compostos nitrogenados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a tolerância de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* à exposição aguda de amônia e nitrito.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Comparar a tolerância à exposição aguda de amônia entre larvas e juvenis de robalo-flecha.
- b) Determinar a concentração letal média (CL₅₀) de amônia em juvenis de robalo-flecha.
- c) Avaliar os efeitos da toxicidade de amônia no tecido branquial de juvenis de robalo-flecha.
- d) Avaliar os efeitos da amônia em alguns parâmetros sanguíneos de juvenis de robalo-flecha: taxa de glicemia sanguínea, hematócrito, número de eritrócitos, proteínas totais e cálcio de juvenis de robalo-flecha.

- e) Determinar a concentração letal média (CL₅₀) de nitrito em juvenis de robalo-flecha.

Formatação dos artigos

O desenvolvimento da tese está dividido em dois capítulos. O capítulo 1 foi publicado na revista *Journal of Applied Aquaculture* (Qualis B3). O capítulo 2 foi redigido conforme as normas da revista *Pan American Journal of Aquatic Sciences* (Qualis B3), submetido em 26/01/2018.

2. CAPÍTULO 1

Mortalidade, hematologia e histopatologia de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) exposto à toxicidade aguda de amônia

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a tolerância de larvas e juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* expostos a concentrações agudas de amônia não ionizada por 96 h em salinidade 35g L⁻¹, após jejum de 24 h. Dez larvas (20,85±1,46 mm) de 47 dias por unidade experimental (1,5 L) foram submetidas por 96 h aos seguintes tratamentos em triplicatas: controle sem amônia (0,00 mg L⁻¹ NH₃) e cinco concentrações crescentes de amônia não ionizada (0,65±0,04; 1,29±0,09; 2,59±0,18; 3,88±0,27; 5,17±0,34 e 6,47±0,43 mg L⁻¹ NH₃, a 26,72±0,08 °C, oxigênio dissolvido em 5,72±0,10 mg L⁻¹ e pH em 8,45±0,06. Durante este período, não foram observadas mortalidades. Outro ensaio foi realizado com cinco juvenis (20,35±6,10 g; 13,90±1,75 cm) por unidade experimental (60 L) expostos a concentrações de amônia não ionizada de 0,00±0,00; 2,26±0,07; 2,68±0,11; 3,20±0,13; 3,68±0,17 e 4,27±0,16 mg L⁻¹ a 21,90±0,76 °C, oxigênio dissolvido em 6,27±0,21 mg L⁻¹ e pH em 8,38±0,04. A mortalidade por peixes aumentou à medida que as concentrações de amônia aumentaram a cada dia, e a concentração letal média de amônia (CL₅₀) 96 h foi 3,52 mg L⁻¹ NH₃. As larvas foram menos sensíveis que os juvenis, indicando que a toxicidade ambiental da amônia para o robalo-flecha é influenciada pela idade. A exposição subletal à amônia causa danos histológicos em brânquias de juvenis bem como variação nos níveis de glicose, hematócrito e contagem total de eritrócitos (RBC), demonstrando efeitos negativos sobre a homeostase dos peixes.

Palavras chave: nitrogênio, peixe marinho, maricultura, concentração letal.

Introdução

Muitas espécies de peixes apresentam importância econômica, e a toxicidade de amônia pode causar mortalidades em condições desfavoráveis de cultivo (Ip e Tsui, 2002). Basicamente, a toxicidade aguda afeta o sistema nervoso dos vertebrados (Randall e Tsui, 2002), e altos níveis internos de amônia têm vários efeitos deletérios em peixes (Ip et al., 2001).

A amônia é um poluente aquático conhecido e tóxico para os peixes, sendo o produto final do metabolismo do nitrogênio, que ocorre principalmente no fígado devido à desaminação de amino ácidos dietéticos, atividade enzimática da flora gastrointestinal e atividades metabólicas de tecidos nervosos e musculares (Evans et al., 2006). É excretada por meio das brânquias por difusão passiva como amônia não ionizada, ou por transporte ativo como íon amônio em troca do sódio (Hargreaves e Kucuk, 2001; Eddy, 2005; Ip e Chew, 2010).

Em solução aquática, a amônia está presente como forma ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3) e a soma de ambas compõe a amônia total nitrogenada (TAN). As formas estão em equilíbrio, sobretudo determinado por pH e temperatura, e em menor grau, pela salinidade (Økelsrud e Pearson, 2007). A forma NH_3 é a mais tóxica, já que difunde pela membrana epitelial dos animais aquáticos mais facilmente que o íon carregado. A exposição dos peixes à amônia ambiental em níveis subletais induz respostas fisiológicas, bioquímicas, histológicas e comportamentais. Coletivamente, essas respostas são mais propensas a suprimir o crescimento e a imunocompetência ao invés de causar mortalidades (Eddy, 2005).

Toxicidade aguda e crônica de amônia foram amplamente estudadas para espécies de água doce, no entanto, os dados de toxicidade de amônia para peixes marinhos são relativamente escassos (Lemarié et al., 2004). A amônia é um dos graves problemas na piscicultura, especialmente nos sistemas de recirculação, aquários e lagoas de peixes (Ip e Chew, 2010). Na piscicultura intensiva, na qual peixes são mantidos em altas densidades, um acúmulo gradual de amônia na água pode ocorrer especialmente quando a troca de água é restrita, limitando a sobrevivência e o crescimento do peixe (Haywood, 1983).

Entre os peixes centropomídeos, o robalo-flecha é a espécie mais promissora em termos de aquicultura (Souza-Filho e Cerqueira, 2003). É demersal, vive em estuários até a migração reprodutiva para o mar (Tucker e Campbell, 1988) e pode ser cultivada intensivamente em

viveiros escavados e tanques rede, ou extensivamente como controlador biológico (Silva e Pereira, 1997). De acordo com Alvarez-Lajonchère e Tsuzuki (2008), o robalo-flecha distribui-se do Oceano Atlântico Tropical e Subtropical Ocidental da Flórida, EUA (28 ° N) até Florianópolis, Brasil (27 ° S).

Desta forma, considerando a importância dos níveis de segurança da amônia e a fim de evitar mortalidades ou perdas no desempenho zootécnico, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda da amônia não ionizada em larvas e juvenis de robalo-flecha. A concentração letal média de amônia (CL_{50}) foi determinada para ambas as idades, além da análise histológica branquial e do estudo dos parâmetros hematológicos para os juvenis.

Material e Métodos

Material Biológico

Dois experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Brasil): o primeiro com larvas e o segundo com juvenis. Para ambos, utilizaram-se exemplares de robalo-flecha obtidos a partir de reprodução artificial (Passini et al., 2016).

Para a execução do primeiro experimento, as larvas foram alimentadas com dieta comercial (55% de proteína bruta) quatro vezes por dia e mantidas em cativeiro a 25 °C em um tanque de fibra de 5000 L com água do mar, renovação diária (100%) e aeração constante.

Para a execução do segundo experimento, juvenis de dez meses foram alimentados com dieta comercial (45% de proteína bruta) duas vezes ao dia e mantidos em cativeiro a 21 °C em um tanque de polietileno de 10.000 L com água do mar, renovada diariamente (100%) e constantemente aerada. Amônia, nitrito e nitrato da água de cultivo mantiveram-se inferiores a 1 mg L⁻¹ em ambos os sistemas.

Sistema experimental

Após 24h de jejum os peixes foram transferidos para unidades experimentais e mantidos em jejum também durante o ensaio, com fotoperíodo de 12 h, água do mar a salinidade de 35 g L⁻¹ sem nitrito e nitrato, com alcalinidade de 120 mg L⁻¹ CaCO₃, temperatura média de 26 e 21 °C para larvas e juvenis, respectivamente. Os procedimentos

envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética sobre o Uso Animal da UFSC (PP00861 nº 82 / CEUA / PROPESQ / 2013).

O sistema experimental foi semi-estático com apenas uma renovação de água e adição de cloreto de amônio (Synth, Brasil) para manutenção das concentrações de amônia a cada 24 h. Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente: alcalinidade por método de titulação (APHA, 2005), nitrito e nitrato com kit colorimétrico (Alfakit, Florianópolis, Brasil), temperatura e oxigênio dissolvido com oxímetro YSI Pro20 (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, EUA) pH com medidor pH10A (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, EUA) e salinidade com refractômetro portátil (Instrutherm RTS-101ATC-03137, São Paulo, Brasil). A amônia total foi quantificada imediatamente após a coleta da amostra de água, conforme descrito por Strickland and Parsons (1972). As concentrações de amônia não ionizada (NH_3) foram calculadas com base em Ostrensky et al., (1992) adaptadas de Whitfield (1974) e Bower e Bidwell (1978), utilizando-se valores de amônia total, pH, temperatura e salinidade.

Larvas de robalo-flecha

Após jejum de 24 h, larvas com 47 dias e $20,85 \pm 1,46$ mm de comprimento foram transferidas para *beackers* de vidro de 2 L com 1,5 L de água e aeração constante. Dez larvas por unidade experimental foram submetidas por 96 h aos seguintes tratamentos em triplicatas: controle sem amônia ($0,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$) e cinco concentrações crescentes de amônia não ionizada ($0,65 \pm 0,04$; $1,29 \pm 0,09$; $2,59 \pm 0,18$; $3,88 \pm 0,27$; $5,17 \pm 0,34$ e $6,47 \pm 0,43 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$, equivalentes a 7,50; 14,80; 29,55; 44,50; 59,30 e 74,20 mg L^{-1} TAN), medidas diariamente. As concentrações nominais foram determinadas em 7,50; 15,00; 30,00; 45,00; 60,00 e 75,00 mg L^{-1} TAN. Uma vez por dia, a água foi renovada em 100% e a TAN foi adicionada. A temperatura da água foi mantida em $26,72 \pm 0,08$ °C, oxigênio dissolvido em $5,72 \pm 0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e pH em $8,45 \pm 0,06$. Durante o período experimental, os peixes foram observados duas vezes ao dia (8 h e 18 h) e não foram alimentados.

Juvenis de robalo-flecha

Um total de 90 peixes ($20,35 \pm 6,10$ g e $13,90 \pm 1,75$ cm) foram distribuídos em 18 tanques de fibra de 100 L de capacidade com 60 L de água, em triplicatas. Cinco peixes por unidade experimental foram expostos a concentrações de amônia não ionizada de $0,00 \pm 0,00$;

2,26±0,07; 2,68±0,11; 3,20±0,13; 3,68±0,17 e 4,27±0,16 mg L⁻¹ (equivalentes a 0,00; 28,03; 33,45; 40,96; 45,75 e 54,99 mg L⁻¹ TAN), medidas diariamente. As concentrações nominais foram determinadas em 0,00; 30,00; 35,00; 40,00; 45,00 e 55,00 mg L⁻¹ TAN. A temperatura da água foi mantida em 21,90±0,76 °C, oxigênio dissolvido em 6,27±0,21 mg L⁻¹ e pH em 8,38±0,04.

Os peixes foram submetidos a 24 h de jejum antes do experimento e durante, sendo observados duas vezes ao dia (8 h e 18 h). A mortalidade foi registrada a cada 24 h para determinar a CL₅₀ 24, 48, 72 e 96 h. Os peixes foram considerados mortos quando nenhuma resposta de movimento foi observada por estímulo mecânico e retirados do tanque em seguida.

Parâmetros hematológicos

Ao final do período experimental os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (50 ppm), o sangue foi retirado da veia caudal com seringas de 1 mL contendo uma gota de EDTA 10%. Após, foram medidos e pesados em escala de precisão (0,01 g). Uma alíquota de sangue foi utilizada para determinar os níveis de glicose utilizando-se equipamentos portáteis (OneTouch Ultra, Brasil). O sangue coletado de dois a cinco peixes de cada repetição foi mantido em 1,5 mL de Eppendorf em gelo.

A contagem total de eritrócitos (RBC) foi realizada na câmara Neubauer após a diluição 1: 200 na solução salina 0,65% (Azevedo et al., 2006). Outra alíquota foi utilizada para determinar a porcentagem de hematócrito por meio de microhematócrito (Micro Spin 1000, Brasil) e centrifugada a 10000 g por 10 min. O sangue restante foi centrifugado (2000 g) durante 10 min a 4 °C e o plasma foi removido e mantido em congelador (-20 °C) até análise de cálcio e proteínas totais por método colorimétrico (Labtest Diagnóstica, S.A., Brasil).

Análise histopatológica

Após a coleta de sangue, os juvenis foram eutanasiados em solução de benzocaína (300 ppm) para a coleta do segundo arco branquial esquerdo. A amostra foi colocada em solução de formalina tamponada (fosfato de sódio dibásico) 10% para desidratação posterior, incorporada na historesina (Kit Leica Instruments, Alemanha), seccionada em 2 µm de espessura e corada com azul de toluidina para observação em microscópio (Leica DM750, Wetzlar, Alemanha). Com exceção do

tratamento com maior concentração de amônia, foram utilizados de dois a cinco peixes de cada tratamento para avaliação histológica. Por problemas de processamento na coloração das lâminas, as brânquias dos peixes expostos a $3,20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ não foram analisadas.

As alterações branquiais foram classificadas em grau 0 - ausente (0%), I - leve (<25%), II- moderado (25-50%) ou III- grave (50-100%), analisadas quanto à hiperplasia epitelial da lamela secundária, hiperplasia interlamelar, fusão da lamela secundária, telangiectasia, congestão do sinus venoso da lamela primária, edema justalamelar, desprendimento epitelial, dilatação do sinus da lamela secundária (Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994).

Análise estatística

Primeiramente os dados foram avaliados quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett e quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados expressos em porcentagem foram transformados em arco seno. Para a determinação da CL_{50} em 24, 48, 72 e 96 h, foram utilizados os dados diários de mortalidade. A CL_{50} e o respectivo intervalo de confiança (95%) foram estimados pelo método de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977).

Os dados dos parâmetros hematológicos (glicose, hematócrito, RBC, cálcio e proteínas totais) foram submetidos à análise de regressão polinomial ($y=ax^2+bx+c$) (nível de significância $P<0,05$). A comparação dos parâmetros hematológicos foi realizada após análise de variância ANOVA (oneway) seguida pelo teste Tukey (nível de significância $P<0,05$).

Resultados

Larvas com 47 dias foram resistentes às concentrações de amônia testadas por 96 h sem apresentar mortalidade. Nos juvenis não expostos à amônia, também não foi observada mortalidade (Tabela 1). A mortalidade dos peixes aumentou à medida que as concentrações de amônia aumentaram a cada dia. Após 72 h de exposição à amônia, as concentrações acima de $4,27 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ causaram 100% de mortalidade em juvenis.

Tabela 1 - Mortalidade (%) de juvenis de *Centropomus undecimalis*, concentração letal média (CL₅₀) com intervalo de confiança de 95% de amônia total nitrogenada (TAN) e amônia não ionizada (NH₃) após exposição de 24, 48, 72 e 96 h (n=5).

Tempo de exposição (h)	Mortalidade (%)					
	Concentração de NH ₃ (mg L ⁻¹)			Concentração de TAN (mg L ⁻¹)		
	0,00±0,00	2,26±0,07	2,68±0,11	3,20±0,13	3,68±0,17	4,27±0,16
24	0,00	0,00	0,00	0,00	26,97	73,33
48	0,00	0,00	0,00	0,00	46,67	93,33
72	0,00	0,00	0,00	0,00	53,33	100,00
96	0,00	0,00	6,67	13,33	60,00	-
					50,16 (47,06-53,45) ^a	3,96 (3,77-4,17) ^a
					46,57 (44,14-49,13) ^{ab}	3,73 (3,56-3,90) ^{ab}
					45,75 (43,77-47,83) ^{ab}	3,67 (3,54-3,81) ^{ab}
					43,81 (41,44-46,32) ^b	3,52 (3,34-3,70) ^b

*Valor médio (intervalo de confiança). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de exposição pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Os níveis de glicose foram maiores (152 mg dL^{-1}) em peixes expostos a $3,20 \text{ mg de L}^{-1} \text{ NH}_3$, seguidos daqueles dos peixes expostos a menores concentrações de amônia (Tabela 2). Os maiores valores de hematócrito (20%), RBC ($1357 \text{ a } 1570 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) e proteínas totais ($3,06 \text{ a } 3,85 \text{ g dL}^{-1}$) foram encontrados em peixes expostos a concentrações intermediárias de amônia. Os níveis de glicose ($y=3,79x^2+19,24x+27,71$; $R^2=0,91$), hematócrito ($y=-1,59x^2+6,09x+14,93$; $R^2=0,88$) e eritrócitos ($y=-41,43x^2+267,02x+1009,00$; $R^2 = 0,85$) nos peixes foram dependentes das concentrações de amônia. As variações no nível plasmático de cálcio e proteínas totais nos peixes expostos à amônia não apresentaram relação com suas concentrações. Quando comparada a peixes não expostos, a concentração de cálcio foi menor nos peixes expostos a $3,20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ ($1,34 \text{ g dL}^{-1}$). Por outro lado, os níveis de proteína total foram menores em peixes não expostos ($1,95 \text{ g dL}^{-1}$).

A análise histológica branquial dos juvenis demonstrou hiperplasia da lamela secundária e edema justalamelar após a exposição de amônia, além da congestão do seio venoso da lamela primária de peixes expostos a $3,68 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos (média±desvio padrão) de juvenis de *Centropomus undecimalis* expostos a diferentes concentrações de amônia não ionizada (NH₃) por 96 h.

Concentração de NH ₃ (mg L ⁻¹)	Glicose ¹ (mg dL ⁻¹)	Hematócrito ² (%)	RBC ² (x 10 ⁴ µL ⁻¹)	Proteínas totais ² (g dL ⁻¹)	Cálcio (g dL ⁻¹)
0,00±0,00	29,00±5,00 ^c	15,00±0,00 ^b	1015,00±45,83 ^b	1,95±0,19 ^b	2,38±0,04 ^a
2,26±0,07	79,00±45,00 ^b	20,00±2,65 ^a	1357,00±92,38 ^a	3,06±0,45 ^a	1,85±0,21 ^{ab}
2,68±0,11	107,00±35,00 ^b	19,67±0,58 ^a	1405,00±95,39 ^a	2,85±0,24 ^{ab}	2,09±0,21 ^a
3,20±0,13	152,00±44,00 ^a	19,67±1,53 ^a	1570,00±68,74 ^a	3,85±0,70 ^a	1,89±0,35 ^{ab}
3,68±0,17	136,00±38,00 ^{ab}	15,00±0,00 ^b	1360,00±100,00 ^a	2,76±0,21 ^{ab}	1,34±0,31 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre concentrações pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Sem peixes sobreviventes expostos a 4,27 mg L⁻¹ por 96 h para amostragem sanguínea. RBC: número de eritrócitos. (¹n=9, ²n=2-5).

Tabela 3 - Níveis de alterações histológicas em brânquias de juvenis de *Centropomus undecimalis* expostos a diferentes concentrações de amônia não ionizada (NH₃) por 96 h.

Alterações histológicas	Concentrações de NH ₃ (mg L ⁻¹)		
	0,00±0,00	2,26±0,07	2,68±0,11
Hiperplasia epitelial da lamela secundária	I	I	I
Hiperplasia interlamelar	0	0	I
Congestão do sinus venoso da lamela primária	0	0	0
Edema justalamelar	I	II	II

Alterações histológicas classificadas como 0- ausente, I- leve, II- moderada, III- severa; referentes a hiperplasia epitelial da lamela secundária, hiperplasia interlamelar, fusão da lamela secundária, telangiectasia, congestão do sinus venoso da lamela primária, edema justalamelar, desprendimento epitelial e dilatação do sinus da lamela secundária (Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994). Brânquias de peixes do tratamento 3,20 e 4,27 mg L⁻¹ não foram analisadas.

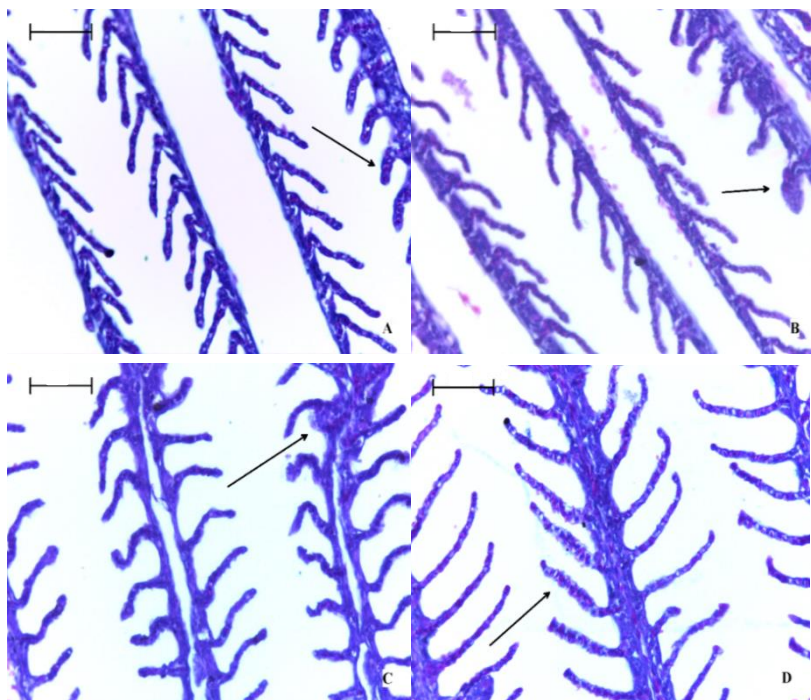


Figura 1 - Alterações histológicas em brânquias de juvenis de *Centropomus undecimalis* expostos a diferentes concentrações de amônia não ionizada (NH_3) por 96 h.

Escala: a barra corresponde a 50 μm .

A – 2,26 mg L^{-1} NH_3 ; seta indica moderada hiperplasia epitelial da lamela secundária.

B – 2,68 mg L^{-1} NH_3 ; seta indica moderada hiperplasia epitelial da lamela secundária.

C – 3,68 mg L^{-1} NH_3 ; seta indica severo edema justalamelar.

D – 0,00 mg L^{-1} NH_3 ; seta indica leve hiperplasia epitelial da lamela secundária.

Discussão

Juvenis de robalo-flecha demonstraram menor resistência à amônia do que larvas, confirmando relatos anteriores (Barton, 2002; Barimo e Walsh, 2005; Martinez et al., 2006; Adelmam et al., 2009; Wang et al., 2015). Segundo Steele et al. (2001), embriões de muitas espécies de teleósteos são altamente tolerantes ao amoníaco externo devido a mecanismos bioquímicos eficientes para a conversão de amônia em substâncias não tóxicas, como glutamina e glutamato.

Ao testar a toxicidade aguda de amônia nas larvas de bacalhau *Gadus macrocephalus*, Wang et al. (2015) também observaram diminuição na tolerância à amônia ao longo da idade. A influência da idade na sensibilidade das larvas à amônia pode estar associada à tendência de diminuição da taxa de sobrevivência ao longo do cultivo (Wang et al., 2015).

Em peixes, a amônia prejudica o equilíbrio iônico a nível celular e organizacional (Wilkie, 2002). A maior parte da intoxicação por amônia é devido à elevação de NH_4^+ , que desloca o íon K^+ e despolariza os neurônios, causando a ativação excessiva do receptor de glutamato do tipo N-metil-d-aspartato (NMDA), o que leva ao influxo de Ca_2^+ e morte celular subsequente no nervo central sistema (Randall e Tsui, 2002). No presente estudo, embora as variações no cálcio plasmático foram detectadas nos peixes expostos à amônia, tal variação não foi relacionada às concentrações de amônia na água.

Além da influência da idade, os peixes respondem à exposição de amônia de formas diferentes (Foss et al., 2003), dependendo das condições ambientais e das características biológicas das espécies (Costa et al., 2008). Portanto, a toxicidade da amônia é difícil de ser comparada e, para os peixes marinhos, geralmente varia de 0,54 mg L⁻¹ para *Centropristis striata* (Weirich e Riche, 2006) para 2,93 mg L⁻¹ do NH_3 para *Gasterosteus aculeatus* (Hazel et al., 1971), espécies mais tolerantes. Diferentemente, a média de LC₅₀ 96 h de 3,52 mg L⁻¹ NH_3 observada para robalo-flecha no presente estudo foi maior que para outras espécies.

Aumentos nos níveis sanguíneos de glicose, na contagem de RBC e, com exceção da maior concentração testada (3,68 mg L⁻¹), na porcentagem de hematócrito dos juvenis de robalo-flecha após a exposição à amônia podem ter sido causados pelo estresse, como sugerido por Mariano et al. (2009). De fato, o estresse em peixes aumenta os níveis de cortisol (Wendelaar Bonga, 1997), estimulando a glicogênese e a gliconeogênese, bem como o catabolismo protéico (Mommsen et al.,

1999), o qual pode ter afetado os níveis de proteína plasmática dos juvenis expostos à amônia.

Embora as variações nos níveis plasmáticos de cálcio e proteínas totais não serem relacionadas a concentrações de amônia, disfunções fisiológicas e metabólicas podem ocorrer por este composto (Nolan et al., 2000). Em peixes, os níveis plasmáticos de proteína dependem de idade, tamanho, sexo (Singh et al., 2008) e ingestão de nutrientes (Wiegertjes et al., 1996), desempenhando função importante no transporte químico endógeno e exógeno (Rudneva et al., 2005). No entanto, uma estratégia fisiológica para evitar a toxicidade da amônia é a redução da proteólise e do catabolismo de aminoácidos, a qual resulta no decréscimo da gênese da amônia (Randall e Tsui, 2002), podendo explicar os maiores níveis de proteínas totais observados no plasma de peixes expostos a amônia.

Em peixes as brânquias são o principal órgão de excreção de amônia (Ip e Chew, 2010), e podem ser danificadas pela toxicidade da amônia (Martinez et al., 2006), afetando os mecanismos respiratórios e osmoregulatórios (Peyghan e Takami, 2002). Desprendimento e hiperplasia epitelial são mecanismos reversíveis de defesa dos peixes para aumentar a distância de difusão entre água e sangue (Hinton et al., 1992), mesmo que a eficiência das trocas de gás e do transporte iônico seja interferida por esse mecanismo (Martinez et al., 2006).

Portanto, danos branquiais causados por alterações ambientais observadas no presente estudo podem ser devido a adaptação de fatores adversos (Martinez et al., 2006), como as condições experimentais. Além disso, outras espécies de peixes neotropicais expostos à amônia apresentaram dano no tecido branquial, como hiperplasia lamelar em tilápia (Benli e Köksal, 2005), *Premnas biaculeatus* (Rodrigues et al., 2014), *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae* (Martinez et al., 2006). Entretanto, telangiectasia e ruptura das células pilares, que são alterações graves e irreversíveis (Hinton et al., 1992), não foram observadas neste estudo.

Conclusão

A toxicidade da amônia ambiental para o robalo-flecha é influenciada pela idade. A concentração letal média (CL₅₀) 96 h de amônia não ionizada (NH₃) é de 3,52 mg L⁻¹ para juvenis e acima de 6,47 mg L⁻¹ para larvas de 47 dias. A exposição subletal à amônia causa danos histológicos em brânquias de juvenis e variação nos níveis de glicose,

hematócrito e contagem total de eritrócitos (RBC), demonstrando efeitos negativos sobre a homeostase dos peixes.

Referências

- Adelman, I., L. Kusilek, J. Koehle, and J. Hess. 2009. Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered topeka shiner (*Notropis topeka*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 2216-2223.
- Alvarez-Lajonchère, L., and M. T. Tsuzuki. 2008. Snook culture potentialities and advances. *Aquaculture Research* 39: 684-700.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In *American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation*. Washington: DC.
- Azevedo, T. M. P., M. L. Martins, M. M. Yamachita, and C. J. Francisco. 2006. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 32: 41-49.
- Barimo, J., and P. J. Walsh. 2005. The effects of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of the gulf toadfish *Opsanus beta*. *Aquatic Toxicology* 75: 225-237.
- Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525.
- Benli, A.C.K., and G. Köksal. 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29, 2: 339-344.
- Bower, C. E., and J. P. Bidwell. 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and, salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35: 1012-1016.
- Costa, L. D. F., K. C. Miranda-Filho, M. P. Severo, and L. A. Sampaio. 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. *Aquaculture* 285: 270-272.

- Eddy, F. B. 2005. Ammonia in estuaries and effect on fish. *Journal of Fish Biology* 67, 6: 1495-1513.
- Evans, J. J., D. J. Pasnik, G. C. Brill, and P. H. Klesius. 2006. Un-ionized Ammonia Exposure in Nile Tilapia: Toxicity, Stress Response, and Susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. *North American Journal of Aquaculture* 68:23–33.
- Foss, A., T. H. Evensen, T. Vollem, and V. Oiestad. 2003. Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish. *Aquaculture* 228: 215-224.
- Hamilton, M. A., R. C. Russo, and R. V. Thurston. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science & Technology* 11: 714-719.
- Hazel, C. R.; W. Thomsen, and S. J. Meith. 1971. Sensitivity of Striped Bass and Stickleback to Ammonia in Relationship to Temperature and Salinity. *California Fish and Game* 57: 138-153.
- Hargreaves, J. A., and S. Kucuk. 2001. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. *Aquaculture* 195: 163-181.
- Haywood, G. P. 1983. Ammonia toxicity in teleost fish: a review. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1177: 1- 35.
- Hinton, D. E., P. C. Baumann, G. R. Gardner, W. E. Hawkins, J. D. Hendricks, R. A. Murchelano, and M. S. Okihiro. 1992. Histopathologic biomarkers. In *Biomarkers - biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*, ed. R. HUGGET, R. KIMERLE, P. MEHRLE, H. BERGMAN, 155-195. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Ip, Y. K., and S. F. Chew. 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: A review. *Frontiers in Physiology* 1: 1-20.
- Ip, Y. K., S. F. Chew, I. A. W. Leung, Y. Jin, C. B. Lim, R. S. S. Wu. 2001. The sleeper *Bostriichthys sinensis* (Family Eleotridae) stores glutamine and reduces ammonia production during aerial exposure. *Journal of Comparative Physiology B* 171: 357–367.
- Lemarié, G., A. Dosdat, D. Coves, G. Dutto, E. Gasset, and J. Person-Le Ruyet. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of

- European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 229: 479-491.
- Mariano, W. S., E. T. Oba, L. R. Santos, L. R., and M. N. Fernandes. 2009. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) expostos ao ar atmosférico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 10: 210-223.
- Martinez, C. B. R., F. Azevedo, and E. U. Winkaler. 2006. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In *Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura*. ed. J. E. P. Cyrino and E.C. Urbinati, 81-95. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática.
- Mommsen, T. P., M. M. Vijayan, T. W. Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 211-268.
- Nolan, D.T., N. M. Ruane, Y. Van Der Heijden, E. S. Quabius, J. Costelloe, and S. E. Bonga. 2000. Juvenile *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) affect the skin and gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and the host response to a handling procedure. *Aquaculture Research* 31, 11: 823-833.
- Økelsrud, A., and R. G. Pearson. 2007. Acute and postexposure effects of ammonia toxicity on juvenile barramundi (*Lates calcarifer* [Bloch]). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53:624-631.
- Ostrensky, A., M. A. Marchiori, and L. H. Poerch. 1992 Toxicidade aguda da amônia no processo produtivo de pós-larvas do camarão-rosa, *Penaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 64: 383-389.
- Passini, G., C. V. A. Carvalho, F. C. Sterzelecki, and V. R. Cerqueira. 2016. Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- β oestradiol implants. *Aquaculture Research* 47: 1090-1099.
- Peyghan, R., and G. A. Takami. 2002. Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention. *Aquaculture International* 10: 317-325.

- Poleksić, V., and V. Mitrović-tutundžić. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish*, ed. R. MÜLLER, R. LLOYD, 339-352. Oxford: Fishing News Books.
- Randall, D. J., and T. K. N. Tsui. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* 45: 17-23.
- Rodrigues, R. V., L. A. Romano, M. H. Schwarz, B. Delbos, and L. A. Sampaio (2014). Acute tolerance and histopathological effects of ammonia on juvenile maroon clownfish *Premnas biaculeatus* (Block 1790). *Aquaculture Research* 45(7): 1133-1139.
- Rudneva, I. I., N. F. Shaevchenko, I. N. Zalevskaya, N. V. Jerko. 2005. Biomonitoring of Black Sea coastal waters. *Water Resources* 32, 2: 238-246.
- Silva, A. L. N., and A. Pereira. 1997. Controle do recrutamento de tilápia vermelha, híbrido de *Oreochromis* spp., por camorim *Centropomus undecimalis* (BLOCH, 1792) em cultivo semi-estensivo. *Boletim do Instituto de Pesca* 24: 161-168.
- Singh, D., K. Nath, S. P. Thrivedi, and Y. K. Sharma. 2008. Impact of copper on haematological profile of freshwater fish *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology* 29, 2: 253-257.
- Souza-Filho, J. J., and V. R. Cerqueira. 2003. Influência da densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha mantidos em laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 11: 1317-1322.
- Steele, S. L., T. D. Chadwick, and P. A. Wright. 2001. Ammonia detoxification and localization of urea cycle enzyme activity in embryos of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to early tolerance to high environmental ammonia levels. *Journal of Experimental Biology*, 204(12): 2145-2154.
- Strickland, J. D., and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. In Fisheries Research Board of Canada, ed. J. C. STEVENSON, 87-90. Ottawa, Canada: Bulletin 167.
- Tucker, J. W. J., and S. W. Campbell. 1988. Spawning season of common snook along the east central Florida coast. *Florida Scientist* 51: 1-6.
- Wang, W., H. Wang, C. Yu, and Z. Jiang. 2015. Acute toxicity of ammonia and nitrite to different ages of Pacific cod (*Gadus*

- macrocephalus*) larvae. *Chemical Speciation & Bioavailability* 27, 4: 147-155.
- Weirich, C. R., and M. A. Riche. 2006. Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities. *Fisheries Science*, 72: 915-921.
- Wendelaar Bonga, S. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77: 591-625.
- Whitfield, M. 1974. The Hydrolysis of Ammonium Ions in Sea Water - A Theoretical Study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54: 565-580.
- Wiegertjes, G. F., R. J. M. Stet, H. K. Parmentier, and W. B. Van Muiswinkel. 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparable approach. *Developmental & Comparative Immunology* 20: 365-81.
- Wilkie, M. P. 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 293(3): 284-301.

3. CAPÍTULO 2

Toxicidade aguda de nitrito em juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* (Perciformes, Centropomidae)

Running headline: Toxicidade aguda de nitrito em robalo-flecha

Resumo

Considerando a importância de níveis seguros de nitrito (NO_2) na piscicultura, o objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* à exposição aguda ao nitrito em salinidade de 30 g L^{-1} . Os peixes ($1,26 \pm 0,39 \text{ g}$ e $5,17 \pm 0,62 \text{ cm}$) foram expostos a cinco concentrações de NO_2 de 250 a 500 mg L^{-1} (em intervalos de 50 mg L^{-1}) por 96 h, mais um grupo controle sem adição de nitrito, em triplicatas. As concentrações testadas foram obtidas por adição do reagente nitrito de sódio. Em sistema semi-estático, manteve-se o fotoperíodo de 12 h, temperatura $14,9 \pm 1,01 \text{ }^\circ\text{C}$, pH $8,0 \pm 0,17$, oxigênio dissolvido $8,5 \pm 0,35 \text{ mg L}^{-1}$, alcalinidade $141,80 \pm 7,68 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e amônia total $0,13 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$. Nenhuma mortalidade, comportamento anormal ou sinais clínicos foram detectados no grupo controle. Por outro lado, houve efeito letal nos peixes expostos. Observou-se aumento da toxicidade do nitrito ao longo do tempo de exposição. A concentração letal média (CL_{50}) 96 h foi de $166,89 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_2$.

Palavras-chave: peixe marinho; maricultura; CL_{50} ; composto nitrogenado

Introdução

O nitrito é um produto intermediário nos processos de nitrificação e desnitrificação bacteriana no ciclo do nitrogênio. A concentração deste composto na água é geralmente baixa (Kroupová et al., 2005), mas pode se acumular em sistemas intensivos de cultivo de peixes, como os sistemas de recirculação da aquicultura (RAS) (Doleželová et al., 2011).

Concentrações elevadas de nitrito causam grandes problemas no cultivo intensivo de espécies comerciais de peixes (Svobodová et al., 2005, Park et al., 2007, Jia et al., 2015). A absorção, o mecanismo de toxicidade e os efeitos fisiológicos da exposição ao nitrito em peixes foram revisados por Jensen (2003) e Kroupova et al. (2005). Basicamente, o nitrito absorvido através do epitélio branquial e intestinal se acumula no plasma, brânquias, fígado, cérebro, baço, músculo e outros tecidos, semelhante à bioacumulação de um poluente (Park et al., 2007).

As disfunções induzidas por nitrito incluem anemia, diminuição nos níveis de proteína sérica (Park et al., 2007); aumento nas concentrações de triglicérides, diminuição da concentração de hemoglobina e consequente aumento da metahemoglobina, além da indução a alterações na homeostase iônica (Jia et al., 2015).

Entre os peixes centropomídeos, o robalo-flecha *Centropomus undecimalis* é a espécie mais promissora em termos de aquicultura (Souza-Filho & Cerqueira 2003, Alvarez-Lajonchère & Tsuzuki 2008) e pode ser cultivada intensivamente em viveiros e tanques-rede, ou extensivamente como controlador biológico (Silva & Pereira, 1997).

Considerando a importância de manter o nitrito em níveis de segurança na água e evitar perdas econômicas no cultivo, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do nitrito em juvenis de robalo-flecha.

Material e Métodos

Os peixes foram produzidos segundo metodologia descrita por Passini et al. (2016) e os procedimentos de acordo com o Comitê de Ética Animal da UFSC (PP00861 / CEUA / PROPESQ / 2013). Grupos de 10 juvenis ($1,26 \pm 0,39$ g e $5,17 \pm 0,62$ cm) foram expostos a cinco concentrações de NO_2 variando de 250 a 500 mg L^{-1} (em intervalos de 50 mg L^{-1}) por 96 h, mais um grupo controle sem adição de nitrito de sódio (Dinâmica, São Paulo, Brasil), em três repetições.

O teste de toxicidade foi realizado em sistema semi-estático, com troca de 100% da água diariamente e fotoperíodo natural (12 h luz). As

unidades experimentais consistiram de *beackers* de vidro com capacidade de 2 L contendo 1,5 L de água do mar filtrada.

Duas vezes ao dia foram observados peixes quanto a mortalidade e comportamento. Os peixes permaneceram em jejum 24 h antes e durante o teste. A água foi constantemente areada, sendo temperatura ($14,9 \pm 1,01$ °C), salinidade ($30,0 \pm 0,2$ g L⁻¹), pH ($8,0 \pm 0,17$), oxigênio dissolvido ($8,5 \pm 0,35$ mg L⁻¹), alcalinidade ($141,80 \pm 7,68$ mg L⁻¹ CaCO₃) e amônia total ($0,13 \pm 0,06$ mg L⁻¹) medidos diariamente.

Os dados foram primeiro avaliados quanto à homogeneidade das variâncias com o teste de Bartlett e para distribuição normal com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados de mortalidade acumulada foram utilizados para calcular a CL₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança (95%) com o método de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). As comparações entre as CL₅₀ para o NO₂ foram realizadas com ANOVA uma via seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 95%.

Resultados

Valores de porcentagem de mortalidade, CL₅₀ NO₂ e o respectivo intervalo de confiança estão apresentados na tabela 1. Durante o período experimental, não foram detectadas mortalidades, comportamento anormal ou sinais clínicos no grupo controle.

A mortalidade acumulada aumentou com o aumento das concentrações de nitrito e o tempo de exposição. Além disso, ao final de 96 h, houve mortalidade em todos os peixes expostos a 426 mg L⁻¹ de NO₂. Observou-se que os indivíduos moribundos apresentaram sintomas de hipoxia, como hiperventilação.

Discussão

Considerando o cultivo em sistemas intensivos, especialmente em recirculação de água, espécies que apresentam resistência a exposição de nitrito são desejáveis (Rodrigues et al., 2007).

Embora seja difícil comparar a toxicidade do nitrito, já que depende de fatores ambientais e fisiológicos, os juvenis de robalo-flecha parecem ser menos tolerantes do que outros peixes. Em relação às espécies marinhas, CL₅₀ 96 h NO₂ geralmente varia de 30 mg L⁻¹ para *Paralichthys orbignyanus* (Bianchini et al., 1996) a 675 mg L⁻¹ para *Chanos chanos* (Almendras, 1987), enquanto outras espécies apresentam toxicidade intermediária como 85 mg L⁻¹ para *Sciaenops ocellatus* (Wise

& Tomasso, 1989) e 199 mg L⁻¹ para larvas de *Odontesthes argentinensis* (Sampaio et al., 2006).

Assim, *C. undecimalis* foi considerada uma espécie que apresenta toxicidade intermediária, com CL₅₀ 96 h de 166 mg L⁻¹ NO₂ no

Tabela 1 - Mortalidade (%) de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* expostos a diferentes concentrações de nitrito (NO₂) e concentração média letal (CL₅₀) em 24, 48, 72 e 96 h de NO₂ (n=10).

Tempo de exposição (h)	NO ₂ (mg L ⁻¹)						CL ₅₀ NO ₂ (mg L ⁻¹)
	0	132	211	280	337	426	
24	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	20,00	* 285,00 (256,67-316,46) ^a 210,49 (191,80-231,00) ^b 166,89 (157,78-176,53) ^c
48	0,00	0,00	26,67	40,00	66,67	86,67	
72	0,00	6,67	46,67	86,67	26,00	100,00	
96	0,00	13,33	86,67	100,00	100,00	-	

Valor médio (intervalo de confiança). Letras diferentes indicam diferença significativa entre concentrações pelo teste Tukey ($P < 0,05$). *Valor não calculável pelo programa.

presente teste. Em outro estudo, apenas 30% dos juvenis de cobia (*Rachycentron canadum*) morreram após a exposição de 210 mg L⁻¹ durante 96 h (Rodrigues et al., 2007), demonstrando maior resistência desta espécie ao nitrito.

Comparados aos vertebrados terrestres, os peixes apresentam mais fatores específicos que interferem na sua sensibilidade ao nitrito, já que as concentrações dentro do organismo variam consideravelmente em função dos mecanismos de adaptação ao ambiente (O'Brien, 2011). De fato, a toxicidade do nitrito para peixes depende de fatores externos e internos, como pH da água, temperatura e concentrações de oxigênio; duração da exposição; espécie, tamanho e idade do peixe; bem como a susceptibilidade individual (Kroupová et al., 2005, Wang et al., 2015).

O mecanismo de toxicidade nos peixes envolve efeitos fisiológicos conhecidos (Dolomatov et al., 2013). Proteínas são vulneráveis aos efeitos adversos do nitrito, por haver formação de complexos nitrosotíois de proteínas plasmáticas, aumentando drasticamente as suas propriedades citotóxicas (Lundberg e Govoni, 2004).

Conforme Takahama et al. (2003), além do efeito direto nas moléculas de proteína, o nitrito pode inibir a atividade da peroxidase, que é essencial na proteção antioxidante do organismo. Assim, ocorre a redução da taxa de neutralização de espécies reativas de oxigênio e o aumento da taxa de degradação de macromoléculas (Takahama et al., 2003).

Sabe-se também que com a exposição de nitrito ocorre a oxidação da molécula de hemoglobina à metahemoglobina, reduzindo a capacidade total de transporte de oxigênio do sangue dos peixes (Cameron, 1971; Jensen, 2007). O aumento da metahemoglobina e redução da hemoglobina ocorre em intensidade proporcional às concentrações de nitrito (Jensen, 2003; Park et al., 2007).

O risco de toxicidade ao nitrito, portanto, depende não apenas das concentrações ambientais mas também das concentrações endógenas geradas pela oxidação acelerada de óxido nítrico(?) nítrico (Hecchia et al., 2000). Efeitos fisiológicos incluem aumento da atividade Na⁺- K⁺-ATPase em brânquias e da família das proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90) em rins e brânquias, além do decréscimo na proteína de água aquaporina 3 (AQP3) nos rins (Deane e Woo, 2007). Segundo Das et al. (2004), tecidos das brânquias, fígado, cérebro e rins de peixes são altamente sensíveis ao nitrito.

Devido aos mecanismos de toxicidade do nitrito apresentados, é possível explicar a mortalidade dos robalos expostos no presente estudo. Especialmente, a influência da metahemoglobina foi evidente,

considerando os sintomas característicos de toxicidade (Kroupová et al., 2005), sugerindo o transporte comprometido de oxigênio nos sangue dos peixes tratados. Após a exposição ao nitrito, os peixes moribundos apresentaram sintomas de hipóxia, seguidos por morte, com coloração acastanhada de brânquias e sangue, além da boca aberta.

Em conclusão, o robalo-flecha tem potencial para cultivos intensivos, tolerando concentrações intermediárias de nitrito. No entanto, cuidados devem ser tomados quanto às concentrações na água dos sistemas, já que a exposição aguda de nitrito de 132 mg L⁻¹ causou mortalidade em juvenis. O aumento da toxicidade foi observado ao longo do tempo de exposição e a CL₅₀ 96 h foi de 166,89 mg L⁻¹ NO₂.

Referências

- Almendras, J. M. E. 1987. Acute nitrite toxicity and methemoglobinemia in juvenile milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). **Aquaculture**, 61: 33-40.
- Alvarez-Lajonchère, L. & Tsuzuki, M. Y. 2008. Snook culture potentialities and advances. **Aquaculture Research**, 39: 684-700.
- Bianchini, A., Wasielesky, W. & Miranda-Filho, K. C. 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 56: 453-459.
- Cameron, J. N. 1971. Methaemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology**, 40: 743-749.
- Das, P. C., Ayyappan, S., Das, B. K. & Jena, J. K. 2004. Nitrite toxicity in Indian major carps: sublethal effect on selected enzymes in fingerlings of *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 138: 3-10.
- Deane, E. E. & Woo, N. Y. 2007. Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*. **Aquatic Toxicology**, 82: 85-93.
- Doleželová, P., Mácová, S., Pištěková, V., Svobodová, Z., Bedáňová, I. & Voslářová, E. 2011. Nitrite toxicity assessment in *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. **Acta Veterinaria Brno**, 80: 309-312.
- Dolomatov, S, Zukow, W., Hagner-Derengowska, M., Kozestanska, M., Jaworska, I. & Nalazek, A. 2013. Toxic and physiological aspects

- of metabolism of nitrites and nitrates in the fish organism. **Journal of Health Sciences**, 3(2): 68-91.
- Hamilton, M. A., Russo R. C. & Thurston, R. V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, 11: 714-719.
- Jensen, F. B. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 135: 9-24.
- Jensen, F. B. 2007. Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. **Journal of Experimental Biology**, 210: 3387-3394.
- Jia, R., Han, C., Lei, J. L., Liu, B. L., Huang, B., Huo, H. H. & Yin, S. T. 2015. Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquatic Toxicology**, 169: 1-9.
- Lundberg, J. O. & Govoni, M. 2004. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, 37: 395-400.
- Kroupová, H., Machová, J. & Svobodová, Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. **Veterinarni Medicina**, 50(11): 461-461.
- O'brien, K. M. 2011. Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes. **The Journal of Experimental Biology**, 214: 275-285.
- Park, I. S., Lee, J., Hur, J. W., Song, Y. C., Na, H. C. & Noh, C. H. 2007. Acute Toxicity and Sublethal effects of nitrite on selected hematological parameters and tissues in dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 38: 188-199.
- Passini, G., Carvalho, C. V. A., Sterzelecki, F. C. & Cerqueira, V. R. 2016. Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- β oestradiol implants. **Aquaculture Research**, 47: 1090-1099.
- Recchia, F. A., Vogel, T. R. & Hintze, Th. H. 2000. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory**, 279: 852-856.
- Riley, J. D. & Thacker, G. T. 1961. Marine fish culture in Britain. III. Plaice (*Pleuronectes platessa* (L.)) rearing in closed circulation at Lowestoft. **Journal du Conseil / Conseil Permanent International pour la mer**, 28: 80-90.

- Rodrigues, R. V., Michael, H. D. & Brendan, C. D. 2007. Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, 271: 553-557.
- Sampaio, L. A., Pisseti, T. L. & Morena, M. 2006. Toxicidade aguda do nitrito em larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae). **Ciência Rural**, 36, 1, 1008-1010.
- Silva, A. L. N. & A. Pereira. 1997. Controle do recrutamento de tilápia vermelha, híbrido de *Oreochromis* spp., por camorim *Centropomus undecimalis* (BLOCH, 1792) em cultivo semi-estensivo. Boletim do Instituto de Pesca 24: 161-168.
- Souza-Filho, J. J. & Cerqueira, V. R. 1997. Influência da densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha mantidos em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(11): 1317-1322.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Drastichová, J., Groch, L., Lusková, V., Poleszczuk, G., Velíšek, J. & Kroupová, H. 2005. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. **Aquaculture Research**, 36: 1177-1184.
- Takahama, U., Yamamoto, A., Hirota, S. & Oniki, T. 2003. Quercetin-dependent reduction of salivary nitrite to nitric oxide under acidic conditions and interaction between quercetin and ascorbic acid during the reduction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 6014-6020.
- Wang, W., H. Wang, C. Yu, & Z. Jiang. 2015. Acute toxicity of ammonia and nitrite to different ages of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) larvae. *Chemical Speciation & Bioavailability* 27, 4: 147-155.
- Wise, D. J. & Tomasso, J. R. 1989. Acute toxicity of nitrite to red drum *Sciaenops ocellatus*: effect of salinity. **Journal of the World Aquaculture Society**, 20: 193-198.

4. CONCLUSÕES GERAIS

a) A toxicidade da amônia ambiental para o robalo-flecha *Centropomus undecimalis* foi maior em juvenis que em larvas.

b) A concentração letal média (CL₅₀) em 96 h de amônia não ionizada (NH₃) foi de 3,52 mg L⁻¹ para juvenis.

c) A exposição a concentrações subletais de amônia causou danos histológicos em brânquias de juvenis.

d) A exposição a concentrações subletais de amônia causou aumento dos níveis de glicose, hematócrito e contagem total de eritrócitos de juvenis de robalo-flecha.

e) A concentração letal média (CL₅₀) em 96 h de nitrito (NO₂) foi de 166,89 mg L⁻¹ para juvenis.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos futuros avaliando a exposição de compostos nitrogenados em robalos poderiam incluir a determinação da concentração plasmática de amônia ou nitrito, de acordo com o teste realizado, para melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade no organismo.

A fim de avaliar os efeitos fisiológicos subletais causados pela exposição aguda de nitrito, análises histopatológicas são importantes para verificar possíveis danos branquiais, e contribuiriam para a compreensão dos resultados, como seria o caso no segundo artigo do presente trabalho. Além disso, os parâmetros hematológicos utilizados no primeiro artigo, como glicose, hematócrito e contagem total de eritrócitos poderiam ser determinados, incluindo também a variação dos níveis plasmáticos de hemoglobina e metahemoglobina, conforme a exposição ao nitrito.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ADELMAN, I.R.; KUSILEK, L.I.; KOEHLE, J.; HESS, J. Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered Topeka shiner (*Notropis topeka*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental toxicology and chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2216-2223, 2009.
- ALCARAZ, G.; S. ESPINA. Acute toxicity of nitrite in juvenile grass carp modified by weight and temperature. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 473-478, 1995.
- ALMENDRAS, J.M.E. Acute toxicity and methemoglobinemia in juvenile milkfish (*Chanos chanos* Forsskae). **Aquaculture**, v. 61, p. 33-40, 1987.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M.Y. Snook culture potentialities and advances. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 684-700, 2008.
- ANDREATTA, E.R.; ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J.B.R. Ensaio sobre desova induzida de tainha, *Mugil brasiliensis* Spix et Agassiz (1931). In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 2, 1981, Recife. Anais... Recife: AEP-PE, 1981. p. 463-468. Resumo.
- ARANA, L.A.V., 2004. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Uma revisão para peixes e camarões. Editora UFSC. 231p.
- ARILLO, A.; MARGIOCCO, C.; MELODIA, F.; MENSI, P.; SCHENONE, G. Ammonia toxicity mechanisms in fish: studies on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 5, n. 3, p. 316-328, 1981.
- ATWOOD, H.L., FONTENOT, Q.C.; TOMASSO, J.R.; ISELY, J.J. Toxicity of nitrite to Nile tilapia: effect of fish size and environmental chloride. **North American Journal of Aquaculture**, v. 63, p. 49-51, 2001.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMACHITA, M.M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação

entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006.

BALDISSEROTO, B. 2002. **Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura**. Editora UFSM, Santa Maria, 212p.

BALOI, M.F.; MAGNOTTI, C.C.F.; STERZELECKI, F.C.; RODRIGUES, R.V.; CERQUEIRA, V.R. Acute toxicity of ammonia in juvenile Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, p. 135-139, 2017.

BARIMO, J.; WALSH, P.J. The effects of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of the Gulf toadfish *Opsanus beta*. **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 225-237, 2005.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.

BENETTI, D.D.; FAGUNDES NETTO, E.B. Considerações sobre desova e alevinagem da tainha (*Mugil Liza Valenciennes*, 1836). **Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas da Marinha**, v. 135, 26 p., 1980.

BIANCHINI, A.; WASIELESKY JR, W.; MIRANDA FILHO, K.C. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 56, n. 3, p. 453-459, 1996.

BOWSER, P.R., W.W. FALLS, J. VANZANDT, N. COLLIER, J.D. PHILLIPS. Methemoglobinemia in channel catfish: methods of prevention. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 45, p. 154-158, 1983.

BOYD, C.E., 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. **Aquaculture**, v. 226, p. 101-112, 2003.

BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. In: *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1995.

BROWN, J.A. Endocrine responses to environmental pollutants. In *Fish ecophysiology*, ed. RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B., 276-296. Berlin: Springer Science & Business Media.

BUDDINGTON, R.K.; KROGDAHL, A.; BAKKEMCKELLEP, A.M. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 161, p. 67-80, 1997.

CAMERON, J.N. Methaemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology**, v. 40, n. 1, p. , 743-749, 1971.

CAMPBELL, J.W. **Excretory nitrogen metabolism**. In: Comparative Animal Physiology (3rd ed.), edited by Prosser CL. Philadelphia, PA: Saunders, 1991, p. 277-324.

CAMPBELL, N.A.; REECE, J.B. Biology. San Francisco, CA: Cummings, 2002.

CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. Marine fish farming in Brazil with emphasis on cobia production. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 6, p. 64-69, 2009.

CAVERO, S.B.A.; PERIERA-FILHO, M.; BORDINHON, A.F.; FONSECA, F.A.; ITUASSU, D.R.; ROUBACH, R.; ONO, E.A. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 513-516, 2004.

CENGIZ E.I.; UNLU, E.; BALCI, K. The histopathological effects of Thiodan on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B**, v. 36, p. 75-85, 2001.

CERQUEIRA, V. R. 2004. Cultivo de Peixes Marinhos. In: *Aquicultura: experiências brasileiras*, ed. POLI, C. R., POLI, A. T. B., ANDREATTA, E., BELTRAME, E. 369-406. Florianópolis: Multitarefa.

CERQUEIRA, V.R., CARVALHO, C.V.A., SANCHES, E.G., PASSINI, G., BALOI, M., RODRIGUES, R.V. Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 94-102, 2017.

CERQUEIRA, V.R.; TSUZUKI, M.Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 17-28, 2009.

CHING, B.Y.; CHEW, S.F.; WONG, W.P.; IP, Y.K. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 203-212, 2009.

COOPER, A.J.L.; PLUM, F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. **Physiological Reviews**, v. 67, p. 440-519, 1987.

COSTA, L.D.F.; MIRANDA-FILHO, K.C.; SEVERO, M.P.; SAMPAIO, L.A. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. **Aquaculture**, v. 285, p. 270-272, 2008.

COSTA, O.T.F.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, p. 627-636, 2004.

CRAWFORD, R.E.; ALLEN, G.H. Seawater inhibition of nitrite toxicity to chinook salmon. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p. 105-109, 1977.

DAS, P.C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J.K.; DAS, B.K. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham): acute toxicity and sub-lethal effect in selected haematological parameters. **Aquaculture**, v. 235, p. 633-644, 2004.

DAOUST, P.Y.; FERGUSON, H.W. The pathology of chronic ammonia toxicity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Disease**, v. 7 p. 199-205, 1984.

DOLEŽELOVÁ, P.; MÁCOVÁ, S.; PIŠTĚKOVÁ, V.; SVOBODOVÁ, Z.; BEDÁŇOVÁ, I.; VOŠLÁŘOVÁ, E. Nitrite toxicity assessment in *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, n. 1, p. 309-312, 2011.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos da limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 602p. 1998.

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

FAO, 2006. Fishstats, FAO Fishery Information, Data and Statistics Unit (FAO-FIDI) 2006 — Collation, Analysis, and Dissemination of Global and Regional Fishery Statistics. FI Programme Websites (UN Food and Agriculture Organization); www.fao.org/fi/default.asp. In: Nations., F.a.A.O.o.t.U. (Ed.), Rome.

FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FERGUSON, H.; POPPE, T.; SPEARE, D. Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 8, p. 225-231, 1990.

FERGUSON, H.W.; MORRISON, D.; OSTLAND, V.E.; LUMSDEN, J.; BYRNE, P. Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, p. 255-265, 1992.

FERNANDES, M.N.; MAZON, A.F. 2003. Environmental pollution and gill morphology. In: *Fish adaptations*, ed. VAL, A.L.; B.G. KAPOOR, 203-223. Science Publishers: Enfield.

FOLMAR, L.C.; BONOMELLI, S.; MOODY, T.; GIBSON, J. The effect of short-term exposure to three chemicals on the blood chemistry of the pinfish (*Lagodon rhomboides*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 24, p. 83-86, 1993.

FOSS, A.; VOLLEN, T.; ØIESTAD, V. Growth and oxygen consumption in normal and O₂ supersaturated water, and interactive effects of O₂ saturation and ammonia on growth in spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). **Aquaculture**, v. 224, n. 1-4, 105-116, 2003.

FRANCES, J.; ALLAN, G.L.; NOWAK, B.F. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 163, p. 63-72, 1998.

FRANCES, J.; NOWAK, B.F., ALLAN, G.L. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 183, p. 95-103, 2000.

GUERDAT, T.C.; LOSORDO, T.M.; CLASSEN, J.J.; OSBORNE, J.A.; DELONG, D.P. An evaluation of commercially available biological filters for recirculating aquaculture systems. **Aquacultural engineering**, v. 42, p. 38-49, 2010.

GILMORE, R.G.; DONOHOE, C.J.; COOKE, D.W. Observations on the distribution and biology of East Central Florida populations of the common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Florida Scientist**, v. 46, p. 313-336, 1983.

GODINHO, H.M.; KAVAMOTO, E.T.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; SERRALHEIRO, P.C.S.; PAIVA, P.; FERRAZ, E. M. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* GUNTHER, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 20, p. 59-66, 1993.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.

HARGREAVES, J.A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 166, p. 181-212, 1998.

HARGREAVES, J.A.; KUCUK, S. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. **Aquaculture**, v. 195, p. 163–181, 2001.

HEATH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1987.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. 1992. Histopathologic biomarkers. In: *Biomarkers - biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*, ed. HUGGET, R.; KIMERLE, R.; MEHRLE, P.; BERGMAN, H., 155-195. Boca Raton: Lewis Publishers.

HOWART, R.W.; ANDERSON, D.; CLOERN, J.; ELFRING, C.; HOPKINSON, C; LAPOINTE, B. Nutrient pollution os coastal rivers, bays, and seas. **Issues in Ecology**, v. 7, p. 1-15, 2000.

HOWELLS, R.G., SONSKI, A.J., SHAFLAND, P.L., HILTON, B.D., Lower temperature tolerance of snook, *Centropomus undecimalis*. **Northeast Gulf Science**, v. 11, p. 155-158, 1990.

HUERTAS, M.; GISBERT, E.; RODRÍGUEZ, A.; CARDONA, L.; WILLIOT, P.; CASTELLÓ-ORVAY, F. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC₅₀) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 57, p. 257-266, 2002.

IP, Y.K.; CHEW, S.F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: A review. **Frontiers in Physiology**, v. 1, p. 1-20, 2010.

JENSEN, F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 135, p. 9-24, 2003.

JIA, R.; HAN, C.; LEI, J.L.; LIU, B.L.; HUANG, B.; HUO, H.H.; YIN, S.T. Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 1-9, 2015.

KNUDSEN, P.K.; JENSEN, F.B. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinemia and potassium balance disturbances in carp. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 16, p. 1-10, 1997.

KROUPOVA, H.; MACHOVA, J; SVOBODOVA, Z. Nitrite influence on fish: a review. **Veterinarni Medicina-Praha**, v. 50, n. 11, p. 461–471, 2005.

LEMARIÉ, G.; DOSDAT, A.; COVE'S, D.; DUTTO, G.; GASSET, E.; RUYET, P. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, 229:479-491, 2004.

- LEWIS, W.M.JR.; MORRIS, D.P. Toxicity of nitrite to fish: a review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 115, p. 183-195, 1986.
- LIM, C.B.; ANDERSON, P.M.; CHEW, S.F.; IP, Y.K. Reduction in the rates of protein and amino acid catabolism to slow down the accumulation of endogenous ammonia: a strategy potentially adopted by mudskippers (*Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*) during aerial exposure in constant darkness. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 1605-1614, 2001.
- LIM, C.K.; WONG, W.P.; LEE, S.M.L.; CHEW, S.F.; IP, Y.K. The ammonotelic African lungfish *Protopterus dolloi* increases the rate of urea synthesis and becomes ureotelic after feeding. **Journal of Comparative Physiology - Part B**, v. 174, p. 555-564, 2004.
- LIN, C.Y.; CHEN, J.C. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. **Aquaculture**, v. 224, n. 1, p. 193-201, 2003.
- LOVELL, T., 1988. Nutrition and Feeding of Fish. 2 ed Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, USA, 1989.
- LOWERRE-BARBIERI, S.K.; VOSE, F.E.; WHITTINGTON, J.A. Catch-and-release fishing on a spawning aggregation of common snook: Does it affect reproductive output? **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 132, p. 940-952, 2003.
- MADISON, B.N.; WANG, Y.S. Haematological responses of acute nitrite exposure in walleye (*Sander vitreus*). **Aquatic toxicology**, v. 79, p. 16-23, 2006.
- MAÑANOS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. C. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*, ed. CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. CRC, p. 4-63, 2008. Boca Raton: Lewis Publishers.
- MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.; FERNANDES, M.N. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) expostos ao

ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 210-223, 2009.

MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. 2006.

Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura. ed. J. E. P. Cyrino and E.C. Urbinati, 81-95. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática.

MARTINEZ, C.B.R.; SOUZA, M.M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology** PART A, n. 133, p. 151–160, 2002.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR.J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

McCORMICK, S.D.; O'DEA, M.F.; MOECKEL, A.M.; BJÖRNSSON, B.T. Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery release. **Aquaculture**, v. 222, p. 45-57, 2003.

MEADE, J. *Aquaculture Management*. AVI Book. New York, 1989 175pp.

MENEZES, N.A.; FIGUEIREDO, J.L. 1980. *Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil*. IV. Teleostei (3). Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999.

MYHRE, P.; NUNES, A.J.; SUPPLY, F.M.; VIDAL, E.A.; ROMBENSO, A.N.; HAYASHI, L.; ... & MATIAS, J.F. World food giant - Brazil aiming to be one of the top five aquaculture producers in 2020. **World aquaculture**, v. 31, 2017.

MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A., ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 516-534, 2010.

NOGA, E.J. 2000. Fish leukocyte responses. In: *Schalm's Veterinary Haematology*, ed. FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. pp. 433-439. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA.

NOLAN, D.T.; RUANE, N.M.; VAN DER HEIJDEN, Y.; QUABIUS, E.S.; COSTELLOE, J.; BONGA, S.E. Juvenile *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) affect the skin and gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and the host response to a handling procedure. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 11, p. 823-833, 2000.

OLIVEIRA, S.S.; WASIELESKY, W.J.R; BALLESTER, E.L.C.; ABREU, P.C. Caracterização da Assembleia de bactérias nitrificantes pelo método “Fluorescente in situ Hybridization” (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, v. 28, p. 33-45, 2006.

OSTRENSKY, A.; MARCHIORI, M.A.; POERSCH, L.H. Toxicidade aguda da amônia no processo produtivo de pós-larvas de *Penaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 64, p. 383-389, 1967.

PALACHEK, R.M.; TOMASSO, J.R. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 41, p. 1739-1744, 1984.

PARK, I.; LEE, J.; HUR, J.; SONG, Y.; NA, H.C.; NOH, C.H. Acute Toxicity and Sublethal Effects of Nitrite on Selected Hematological Parameters and Tissues in Dark-banded Rockfish, *Sebastes inermis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 188-199, 2007.

PARRA, G.; YUFERA, M. Tolerance response to ammonia and nitrite exposure in larvae of two marine fish species (gilthead seabream *Sparus aurata* L. and Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup). **Aquaculture Research**, v. 30, n. 11-12, p. 857-863, 1999.

PASSINI, G.; CARVALHO, C.V.A.; STERZELECKI, F.C.; CERQUEIRA, V.R. Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- β oestradiol implants. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 1090-1099, 2016.

PENG, K.W.; CHEW, S.F.; LIM, C.B.; KUAH, S.S.L.; KOK, W.K.; IP, Y.K. The mudskippers *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH_3 concentrations of 446 and $36\mu\text{M}$, respectively. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 59-69, 1998.

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

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

PEYGHAN, R.; TAKAMI, G.A. Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention. **Aquaculture International**, v. 10, p. 317-325, 2002.

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F.; MORAES, P.R.R.; CARDOSO, D.F. Lethal concentration (CL_{50}) of un-ionized ammonia for pejerrey larvae in acute exposure. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 2, p. 184-186, 2006.

POTTINGER, T.G. Modulation of the stress response in wild fish is associated with variation in dissolved nitrate and nitrite. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 550-558, 2017.

RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 17-23, 2002.

RANDALL, D.J.; WILSON, J.M.; PENG, K.W.; KOK, T.W.K.; KUAH, S.S.L.; CHEW, S.F.; LAM, T.J.; IP, I.K. The mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri*, actively transports NH_4^+ against a concentration gradient. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 6, p. 1562-1567, 1999.

RHODY, N.R.; PUCHULUTEGUI, C.; TAGGART, J.B.; MAIN, K.L.; MIGAUD, H. Parental contribution and spawning performance in captive common snook *Centropomus undecimalis* broodstock. **Aquaculture**, v. 432, p. 144-153, 2014.

RIVAS, L.R. Systematic review of perciform fishes of the genus *Centropomus*. **Copeia**, v. 6, p. 576-611, 1986.

RODRIGUES, R.V.; SCHWARZ, M.H.; DELBOS, B.C. Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 553-557, 2007.

RODRIGUES, R.V.; SCHWARZ, M.H.; DELBOS, B.C.; CARVALHO, E.L.; ROMANO, L.A.; SAMPAIO, L.A. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. **Aquaculture**, v. 322, p. 223-226, 2011.

RODRIGUES, R.V.; ROMANO, L.A.; SCHWARZ, M.H.; DELBOS, B.; SAMPAIO, L.A. Acute tolerance and histopathological effects of ammonia on juvenile maroon clownfish *Premnas biaculeatus* (Block 1790). **Aquaculture research**, v. 45, n. 7, p. 1133-1139, 2014.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do MayGrünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 34, p. 28-35, 2003.

RUSSO, R.C.; **Nitrite toxicity to fishes**. Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality: Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, April 24-28, 2006. ed.

RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V.; EMERSON, K. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Effects of pH, nitrite species, and anion species. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, p. 387-393, 1981.

SAMPAIO, L.A.; WASIELESKY, W.; MIRANDA-FILHO, K.C. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 668-674, 2002.

SAMPAIO, L.A.N.D.; PISSETTI, T.L.; MORENA, M. Toxicidade aguda do nitrito em larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae). **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 1008-1010, 2006.

SAROGLIA, M.G.; SCARANO, G.; TIBLADI, E. Acute toxicity of nitrite to sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and European eel (*Anguilla anguilla*). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 12, p. 121-126, 1981.

SAWHNEY, A.K.; JOHAL, M.S. Erythrocyte alterations induced by malathion in *Channa punctatus* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 398-405, 2000.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. 1998. Limnologia dos sistemas de cultivo. In: *Carcinicultura de água doce*. p. 47-75. São Paulo: FUNEP.

SOUSA, P.H.C., SANTOS, M.D.L.S., SANTOS, R.M., DE SOUZA, R. A.L., MOURÃO, F.V., DE SOUSA, A.C.S.R., ... & DE LIMA SARAIVA, A.L. Quality of water in tanks of juvenile of Snook *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) Curuçá, state of Pará, Brazil. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, 2016.

STORMER, J.; JENSEN, F.B.; RANKIN, J.C. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 53, p. 1943-1950, 1996.

SVOBODOVÁ, Z.; MÁCHOVÁ, J.; DRASTICHOVÁ, J.; GROCH, L.; LUSKOVÁ, V.; POLESZCZUK, G.; VELISEK, J.; KROUPOVÁ, H. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1177-1184, 2005.

TAL, Y.; WATTS, J.E.M.; SCHREIER, H.J. Anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) bacteria and related activity in fixed-film biofilters

of a marine recirculating aquaculture system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2896-2904, 2006.

TAYLOR, R.G.; WHITTINGTON, J.A.; GRIER, H.J.; CRABTREE, R.E. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in the common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of Florida. **US National Marine Fisheries Service Fishery Bulletin**, v. 98, p. 612-624, 2000.

TOMASSO, J.R. Comparative toxicity of nitrite to freshwater fishes. **Aquatic Toxicology**, v. 8, p. 129-137, 1986.

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

TOMASSO, J.R.; GROSELL, M. Physiological basis for large differences in resistance to nitrite among freshwater acclimated euryhaline fishes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 98-102, 2005.

TUCKER, J.W.JR. (1998) **Marine Fish Culture**. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, USA.

TUCKER, J.W.JR. Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation of commercial farming. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 49, p. 49-57, 1987.

TUCKER, J.W.JR. Snook culture. **American Fisheries Society Symposium**, v. 46, p. 297-305, 2005.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) 1984. Ambient water quality criteria for ammonia - 1984. National Technical Information Service, Springfield, VA.

USEPA 1989. Ambient water quality criteria for ammonia (saltwater). National Technical Information Service, Springfield, VA.

USEPA 1998. Addendum to "Ambient water quality criteria for ammonia - 1984". National Technical Information Service, Springfield, VA.

WANG, W.; WANG, H.; YU, C.; JIANG, Z. Acute toxicity of ammonia and nitrite to different ages of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) larvae. *Chemical Speciation & Bioavailability*, v. 27, n.4, p. 147-155, 2015.

WANG, Y.; WALSH, P.J. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquatic Toxicology*, v. 50, p. 205-219, 2000.

WEIRICH, C.R.; RICHE, M. Acute tolerance of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus* L., to ammonia and nitrite at various salinities. *Aquaculture Research* v. 37, p. 855-861, 2006.

WENDELAAR BONGA, S. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v. 77, p. 591-625, 1997.

WICKS, B.J.; RANDALL, D.J. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, v. 132, p. 275-285, 2002.

WILKIE, M.P. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, v. 293, n. 3 p. 284-301, 2002.

WISE, D.J.; TOMASSO, J.R. Acute toxicity of nitrite to red drum *Sciaenops ocellatus*: effect of salinity. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 20, p. 193-198, 1989.

WOO, N.Y.S.; CHIU, S.F. Metabolic and osmoregulatory responses of the sea bass *Lates calcarifer* to nitrite exposure. *Environmental Toxicology and Water Quality*, v. 12, p. 257-264, 1997.

WOOD, C.M. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: *The Physiology of Fishes*, ed. EVANS, D.H. Florida: CRC, 1993. Boca Raton: Lewis Publishers.

YOGEV, U.; SOWERS, K.R.; MOZES, N.; GROSS, A. Nitrogen and carbon balance in a novel near-zero water exchange saline recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, v. 467, p. 118-126, 2017.