

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA

Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de  
larvas e juvenis de pacamã *Lophiosilurus alexandri*  
expostos à amônia e ao nitrito em diferentes  
salinidades e temperaturas

MÁRCIO JOSÉ DOS SANTOS SILVA

Belo Horizonte

2017

MÁRCIO JOSÉ DOS SANTOS SILVA

Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de larvas e juvenis de pacamã *Lophiosilurus alexandri* expostos à amônia e ao nitrito em diferentes salinidades e temperaturas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na área de concentração Produção Animal no Departamento de Zootecnia da escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz

BELO HORIZONTE

2017

S586u Silva, Márcio José dos Santos, 1979-  
Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de larvas e juvenis de pacamã *Lophiosilurus alexandri* expostos à amônia e ao nitrito em diferentes salinidades e temperaturas / Márcio José dos Santos. – 2017.  
85 p. : il.

Orientador: Kleber Campos Miranda Filho

Co-orientador: Ronald Kennedy Luz

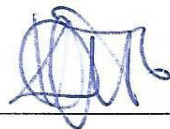
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Pacamã (Peixe) – Teses. 2. Biomarcadores – Uso – Teses. 3. Salinidade – Teses. 4. Nitritos – Toxicologia – Teses. 5. Amônia – Teses. I. Miranda Filho, Kleber Campos. II. Luz, Ronald Kennedy. III. Borges, Iran. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 639.31

TESE defendida e aprovada em 21/02/2017 pela comissão organizadora composta pelos seguintes membros:



---

Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho



---

Profª. Drª. Daniela Chemim de Melo Hoyos



---

Drª. Deliane Cristina Costa



---

Profª. Drª. Teofania Heloisa Dutra Amorim Vidigal



---

Prof. Dr. Walter Motta Ferreira

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, especialmente ao professor Dr. Kleber Campos Miranda Filho, pela orientação, amizade, confiança e carinho; aos professores Dr. Ronald Kennedy Luz pela co-orientação, e Dr. José Dias Corrêa Júnior pelo auxílio e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho; aos meus colegas de laboratório pela colaboração, apoio e amizade; à minha família pelo apoio, sacrifício e incentivo; e por fim ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	6
Lista de figuras.....	8
Lista de abreviaturas.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	12
1. Revisão de literatura.....	14
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivo específico.....	27
4. Artigo 1: Toxicidade aguda em larvas de pacamã <i>Lophiosilurus alexandri</i> de diferentes idades expostas à amônia e ao nitrito em duas salinidades e três temperaturas.....	28
5. Artigo 2: Biological responses of Neotropical freshwater fish <i>Lophiosilurus alexandri</i> exposed to ammonia and nitrite.....	49
6. Considerações finais.....	82

## LISTA DE TABELAS

**ARTIGO 1: Toxicidade aguda em larvas de pacamã *Lophiosilurus alexandri* de diferentes idades expostas à amônia e ao nitrito em duas salinidades e três temperaturas.**

Tabela 1. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das concentrações testadas de amônia (N-NH<sub>3</sub>) e nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) em mg/L nas larvas de 24 h e sete dias de *Lophiosilurus alexandri* nas salinidades 0 e 2‰ em 96 horas (primeiro teste) e no segundo teste com larvas de 20 dias expostas a N-NH<sub>3</sub> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em mg/L em três temperaturas em ambiente salobro (2‰)..... 34

Tabela 2. Médias ( $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos em 96 h de exposição nos testes de toxicidade aguda com amônia e nitrito com larvas de pacamã *Lophiosilurus alexandri* com 24 h e sete dias após eclosão em 2 salinidades (Primeiro Teste), e larvas de 20 dias na salinidade de 2‰ em 3 temperaturas (Segundo Teste)... 36

Tabela 3. Concentrações medianas letais (CL<sub>50</sub>96 h) e intervalos com limites de 95% de confiança (IC) em mg/L<sup>-1</sup> nos testes agudo com amônia e nitrito em larvas de 24h e 7 dias em 2 salinidades (0 e 2‰), e larvas de 20 dias em 3 temperaturas ..... 38

Tabela 4. Níveis de segurança (NS) para as larvas do *L. alexandri* de acordo com Sprague, (1971) após 96h de exposição à amônia e ao nitrito em diferentes idades em duas salinidades..... 39

**ARTIGO 2: Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite**

Table 1. Mean ( $\pm$  SD) of *Lophiosilurus alexandri* blood parameters after 96 hours of acute exposure to ammonia..... 58

Table 2. Mean ( $\pm$  SD) of *Lophiosilurus alexandri* blood parameters after 96 hours of acute exposure to nitrite..... 59

Table 3. Mean ( $\pm$  SD) of *Lophiosilurus alexandri* blood parameters in subchronic toxicity test to ammonia and nitrite..... 60

Table 4. Mean ( $\pm$ SD) of <i>Lophiosilurus alexandri</i> blood parameters after detoxification test to ammonia and nitrite.....	62
Table 5. Indices of gill lesions (I <sub>G</sub> ) in <i>Lophiosilurus alexandri</i> juvenile after acute exposure (96 hours). subchronic (8 days) and detoxification test (4 days).....	65



## LISTA DE FIGURAS

**ARTIGO 1:**

Figura 1: Fotomicrografias de brânquias em larvas expostas a  $\text{NH}_3$  e  $\text{NO}_2^-$ .....41

**ARTIGO 2:**

Figure 1. Photomicrographs of *Lophiosilurus alexandri* gill after acute exposure (96 hours), sub-chronic (8 days) and detoxification test (4 days).....64

Figure 2. Photomicrographs of *Lophiosilurus alexandri* liver after acute exposure (96 hours), Subchronic (8 days) and detoxification testing (4 days).....66

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Amônia total
CK	Creatina kinase
CL <sub>50</sub>	Concentração letal mediana
LAQUA	Laboratório de aquacultura
mg/L	Miligrama por litro
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio na forma de amônia
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Íon amônio
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrogênio na forma de nitrito
NS	Nível de segurança
g/dL	Gramas por decilitro
UI	Unidade Internacional

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância (CL<sub>50-96h</sub>) das larvas de pacamã *Lophiosilurus alexandri*, com um e sete dias de vida em diferentes salinidades e larvas com vinte dias nas temperaturas de 25,80±0,17°C; 29,07±0,22°C e 31,53±0,24°C com 2‰ de salinidade. Juvenis desta mesma espécie (com cento e vinte dias de vida) também foram expostos agudamente a concentrações crescentes de amônia e nitrito. Adicionalmente os juvenis foram submetidos à intoxicação semi crônica por oito dias e desintoxicação de quatro dias para avaliação hematológica. As CL<sub>50-96h</sub> das larvas de um dia foram de 0,62 (NS= 0,06) mg/L N-NH<sub>3</sub> nos tratamentos sem a adição de sal na água e 0,59 (NS= 0,06) mg/L N-NH<sub>3</sub> na água com 2‰ de salinidade. Com sete dias de vida, as larvas em ambiente salobro foram estatisticamente ( $P<0,05$ ) mais tolerantes, sendo as CL<sub>50-96h</sub> estimadas em 1,11 (NS= 0,1) mg/L N-NH<sub>3</sub> em água doce e 1,74 (NS= 0,17) mg/L N-NH<sub>3</sub> em meio salobro e 3,06 (NS= 0,3) mg/L N-NH<sub>3</sub> em animais de 20 dias. O nitrito foi significativamente ( $P<0,05$ ) mais tóxico para larvas de 1 dia mantidas em água doce, CL<sub>50-96h</sub> = 170,39 (NS= 17,0) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> do que em ambiente salinizado = CL<sub>50-96h</sub> = 967,98 (NS= 96,98) mg/L<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Nas larvas de sete dias de vida, as CL<sub>50-96h</sub> foram estimadas em 234,05 (NS= 23,4) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e 495,97 (NS= 40,5) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, para água doce e salobra, respectivamente. Nas três temperaturas testadas (26, 29 e 32°C) com NH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em ambiente salobro, não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos, e as CL<sub>50-96h</sub> foram estimadas em 3,06 (NS= 0,3); 2,63 (NS= 0,26) e 3,66 (NS= 0,37) mg/L N-NH<sub>3</sub>, respectivamente. Já as CL<sub>50-96h</sub> estimadas para o nitrito foram 342,70 (NS= 34,3); 347,49 (NS= 34,7) e 388,03 (NS= 38,8) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Já os juvenis de 120 dias responderam com CL<sub>50-96h</sub> = 3,66 mg/L N-NH<sub>3</sub> e 5,86 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, respectivamente. A análise histopatológica nas larvas constatou que as brânquias estavam em desenvolvimento e diferenciação

tecidual. A lesão mais encontrada foi descolamento de epitélio respiratório. Os resultados indicam que com a idade e em ambiente salobro, a larva do pacamã aumentou a tolerância frente a intoxicação com amônia. A salinidade elevou a tolerância das larvas ao nitrito, mas esta diminuiu com o desenvolvimento da idade. A exposição aguda à amônia elevou as enzimas transaminases, glicose e ureia. A concentração de ureia permaneceu elevada nos testes sub crônico e de desintoxicação. A lesões mais observadas foram descolamento do epitélio respiratório, hiperemia e necrose. A exposição ao nitrito também causou descolamento de epitélio e aneurisma. A vacuolização e edema dos hepatócitos foram efeitos causados por ambos poluentes. Conclui-se que a tolerância do pacamã aos compostos nitrogenados aumenta com o aumento da idade e do tamanho da larva, e em ambiente salinizado a 2‰. Neste estudo constatamos também que a toxicidade não se diferenciou nas três temperaturas testadas. Já os juvenis apresentam moderada tolerância aos compostos nitrogenados e o período de recuperação apresentou resposta corretiva aos danos subcrônicos causados por estes poluentes.

Palavras chave: Aquacultura, Siluriformes, Toxicidade, compostos nitrogenados.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the tolerance (LC<sub>50-96h</sub>) of the larvae of pacamã *Lophiosilurus alexandri*, with one and seven days of life in different salinities and larvae with twenty days at the temperatures of 25.80± 0.17°C; 29.07±0.22°C and 31.53±0.24°C with 2 ‰ of salinity. Juveniles of this same species (one hundred and twenty days of life) were also exposed acutely to increasing concentrations of ammonia and nitrite. Additionally juveniles were submitted to semi-chronic intoxication for eight days and four days detoxification for hematological evaluation. The LC<sub>50-96h</sub> of the one-day larvae were 0.62 (NS = 0.06) mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N in the treatments without the addition of salt in water and 0.59 (NS = 0.06) mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N in water with 2 ‰ of salinity. At seven days of age, the brackish larvae were statistically more tolerant (P <0.05), with LC<sub>50-96h</sub> estimated to be 1.11 (NS = 0.1) mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N in freshwater and 1.74 (NS = 0.17) mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N in barley medium and 3.06 (NS = 0.3) mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N in 20 day animals. Nitrite was significantly (P <0.05) more toxic for 1-day larvae maintained in freshwater, LC<sub>50-96h</sub> = 170.39 (NS = 17.0) mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N than in the salinized environment = LC<sub>50-96h</sub> = 967.98 (NS = 96.98) mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N. In the larvae of seven days of life, LC<sub>50-96h</sub> were estimated to be 234.05 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N and 495.97 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, for fresh and brackish water, respectively. At the three temperatures tested (26, 29 and 32°C) with NH<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the brackish environment, there were no significant differences (P > 0.05) between the treatments, and the LC<sub>50-96h</sub> were estimated at 3.06 (NS = 0.3); 2.63 (NS = 0.26) and 3.66 (NS = 0.37) mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N, respectively. The estimated LC<sub>50-96h</sub> for nitrite was 342.70 (NS = 34.3); 347.49 (NS = 34.7) and 388.03 (NS = 38.8) mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N. The juveniles of 120 days responded with CL<sub>50-96h</sub> = 3.66 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N and 5.86 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, respectively. Histopathological analysis of larvae found that gills were developing and tissue

differentiation. The most frequent lesion was respiratory epithelial detachment. The results indicate that with age and in a brackish environment, the pacamã larva increased tolerance to ammonia intoxication. Salinity increased larval tolerance to nitrite, but decreased with age development. Acute exposure to ammonia has elevated the enzymes transaminases, glucose and urea. The urea concentration remained high in the subchronic and detoxification tests. The most observed lesions were respiratory epithelial detachment, hyperemia and necrosis. Exposure to nitrite also caused epithelial detachment and aneurysm. Vaccination and edema of hepatocytes were effects caused by both pollutants. It is concluded that the tolerance of pacamã to nitrogen compounds increases with increasing age and larval size, and in salinized environment at 2 ‰. In this study we also verified that the toxicity did not differ in the three temperatures tested. The juveniles present moderate tolerance to the nitrogen compounds and the recovery period presented a corrective response to the subchronic damages caused by these pollutants.

Keywords: Aquaculture, Siluriformes, Toxicity, nitrogen compounds.

## REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil, devido à sua riqueza de espécies de peixes com potencial para aquicultura, foi marcado nas últimas décadas, por incentivos à produção comercial aquícola a partir do desenvolvimento de pacotes tecnológicos. Hoje a criação de peixes de água doce tem sido realizada em regime semi-intensivo e intensivo com o intuito de aumentar a sobrevivência larval, o desempenho e minimizar a incidência de doenças e parasitas (Luz & Portella, 2002; El-Sayed, 2006; Luz & dos Santos, 2008a,b).

A manutenção da qualidade da água e o conhecimento dos limites físico químicos toleráveis de uma espécie são requisitos indispensáveis em qualquer sistema de aquicultura (Spotte, 1979). Segundo Ostrensky & Wasielesky (1995), tais fatores influenciam decisivamente o sucesso ou fracasso dessa atividade produtiva.

Em relação às variáveis de qualidade da água, a amônia ( $\text{NH}_3$ ) e o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) são substâncias que ocorrem naturalmente no meio aquoso. Esses compostos nitrogenados são considerados poluentes na aquicultura por causar danos crônicos e até mortalidades (Thurston & Russo, 1978; Sampaio et al., 2002; Costa et al., 2008). Por essa razão, o conhecimento dos níveis desses metabólitos dissolvidos ( $\text{NH}_3$  e  $\text{NO}_2^-$ ) no ambiente de cultivo é imprescindível e ganham ênfase em sistemas intensificados de cultivo, em sistemas fechados de recirculação e durante o transporte dos organismos cultivados, pois a presença desses compostos é preocupante mesmo em baixos níveis (inferiores a 0,5 mg/L N- $\text{NH}_3$  e 1 mg/L N- $\text{NO}_2^-$ ) (Pillay, 2005).

A concentração e o tempo necessário para que um composto produza um efeito adverso, varia conforme o agente químico, a espécie e a severidade do efeito (Rand & Petrocelli, 1985). De acordo com Wajsbrodt et al. (1993), a sensibilidade dos organismos

para um dado agente tóxico pode variar de acordo com o seu estágio de desenvolvimento (tamanho, idade), assim como o seu estado de saúde. Rand & Petrocelli (1985) relatam que a diferença na tolerância a um determinado poluente é normalmente pequena para organismos de mesma espécie e idade similares, e geralmente maiores entre espécies diferentes, e os efeitos adversos ou tóxicos podem ser produzidos em laboratório ou no ambiente natural, por meio de exposições letais (teste de toxicidade aguda) ou subletais (teste de toxicidade crônica).

O acúmulo de compostos nitrogenados em ambientes aquícolas se deve principalmente à excreção dos peixes que em sua maioria são amoniotélicos (Evans et al., 2006), pela degradação da dieta que contêm altos níveis protéicos (não consumido e acumulado) e oxidação incompleta do íon amônio ao nitrito por bactérias nitrificantes em sistemas de recirculação e super-intensivos (Peyghan & Azary Takamy, 2002).

A amônia é o produto final do catabolismo proteico da maioria dos organismos aquáticos, e em meio aquoso, está presente na forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) e não ionizada ( $\text{NH}_3$ ); sendo que, a soma das duas formas constitui a amônia total ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ). A proporção de cada uma destas duas formas no meio depende principalmente do pH e, em menor grau, da temperatura e da salinidade (Boyd, 1982; Hargreaves, 1998). Muitos pesquisadores concordam que a forma química mais tóxica é a amônia não ionizada, por sua natureza gasosa, assim como, devido a capacidade de difusão pelas membranas celulares (Regnault, 1987) e, também pelo fato de que o efeito tóxico da amônia ionizada ser considerado menos pronunciado (Randall & Tsui, 2002). Através da difusão, a  $\text{NH}_3$  é excretada por via paracelular principalmente pelas brânquias (Evans et al., 1999), contudo, uma elevação na concentração da  $\text{NH}_3$  na água, impede sua liberação no meio levando à intoxicação do organismo.



Ao contrário da amônia, o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é mais tóxico para organismos de água doce do que para os marinhos (Grosell & Jensen, 2000; Jensen, 2003; Svobodová et al., 2005), pois acredita-se que o ambiente salino favoreça a competição entre íons diminuindo o influxo de  $\text{NO}_2^-$  proveniente do meio externo para o interior do organismo pelas vias branquial e intestinal (Grosell & Jensen, 2000; Sampaio et al., 2002; Baldisserotto, 2009). Este poluente pode ser bastante tóxico, de acordo com a sua concentração no meio e do estágio de desenvolvimento em que se encontram os organismos cultivados (Miranda-Filho et al., 1995; Bianchini et al., 1996; Rodrigues et al., 2007).

Nas brânquias, o  $\text{NO}_2^-$  é absorvido através das células de cloreto localizadas na base das lamelas secundárias (Gisbert et al., 2004). Uma vez na corrente sanguínea este oxida de forma reversível a molécula de ferro, do estado ferroso a férrico na hemoglobina dando origem à metahemoglobina (Lewis & Morris, 1986; Martinez & Souza, 2002), incapaz de se ligar ao oxigênio (Jensen, 2003). Como consequência desta intoxicação podem ocorrer distúrbios fisiológicos como hipóxia, anemia hemolítica (Tucker et al., 1989), fermentação láctica no músculo branco (Moraes et al., 2006) e lesões teciduais (Gisbert, 2004), possivelmente resultando em mortalidade dos organismos cultivados (Chen & Chin, 1988; Jensen, 2003).

Mecanismos adaptativos envolvendo alterações da permeabilidade de membrana, aumento na atividade da glutamina sintetase e glutamato desidrogenase foram citados como responsáveis pelo aumento da tolerância à amônia (Tomasso, 1994; Randall & Tsui, 2002). No caso do nitrito, a elevação na concentração dos ânions monovalentes na água atua como inibidor competitivo por sítios de ligação, e conseqüentemente o aporte do  $\text{NO}_2^-$  no peixe, sendo a principal estratégia de prevenção à intoxicação (Svobodová et al., 2005).

Desta forma, dentre os estudos necessários para a escolha de uma espécie para a atividade aquícola destacam-se os testes de tolerância às diferentes variáveis de qualidade da água. Contudo, os trabalhos relatando os efeitos da exposição aos produtos nitrogenados para peixes nativos do Brasil são escassos. Cardoso et al. (1996) estudaram os efeitos da exposição à amônia em larvas e juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) e detectaram alterações morfológicas nas brânquias. Os autores relataram que as lesões branquiais foram responsáveis pela mortalidade de 50% dos organismos expostos à concentração de 0,48 mg/L de NH<sub>3</sub>.

Na literatura, a maioria dos trabalhos relata o problema da toxicidade da amônia em ambientes de água doce, porém para peixes exóticos (Hargreaves & Kucuk, 2001; El-Shafai et al., 2004; Benli & Köksal, 2005). Para exemplificar, as concentrações letais medianas (CL<sub>50</sub>) estimadas para larvas e juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* foram CL<sub>50-48h</sub> = 1,01 e 7,4 mg/L NH<sub>3</sub>, respectivamente (Benli & Köksal, 2005). Benli et al. (2008) encontraram histopatologias em tilápias mantidas por 6 semanas a concentrações  $\geq 2$  mg/L N-AT (Amônia Total). De acordo com El-Shafai et al. (2004), a concentração de amônia gasosa deve ser mantida abaixo de 0,1 mg/L N-NH<sub>3</sub> para evitar efeitos deletérios para a tilápia. A CL<sub>50</sub> de NH<sub>3</sub> tem sido estudada em algumas espécies de tilápia, incluindo organismos híbridos. Redner & Stickney (1979) estimaram a CL<sub>50-48h</sub> para *O. aureus* em 2,46 mg/L NH<sub>3</sub>, o que coloca a tilápia azul como um organismo tolerante à amônia.

Com relação ao nitrito, da mesma forma que para a amônia, Atwood et al. (2001) detectaram uma maior tolerância em formas jovens de tilápia do Nilo (4,4 g) do que em peixes adultos (90,7 g). As CL<sub>50-96h</sub> foram estimadas em 81 e 8 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, respectivamente.

O maior volume de pesquisas com tilápia e compostos nitrogenados se dá em função da importância desse peixe para a aquicultura. No entanto, por ser uma espécie exótica, esforços vêm sendo direcionados ao desenvolvimento da cadeia produtiva de espécies nativas. Logo, informações sobre as primeiras fases de desenvolvimento de pacamã frente à exposição aos produtos nitrogenados em ambiente controlado, assim como uma abordagem mais elaborada de indicadores biológicos da toxicidade dos mesmos se faz necessária para comprovar se a espécie realmente pode ser uma realidade na aquicultura brasileira.

O peixe popularmente conhecido como pacamã é uma espécie neotropical de couro e hábito bentônico, da família Pseudopimelodidae (Ordem Siluriforme), piscívoro em ambiente natural, mas que aceita dieta comercial para peixes quando treinado e se reproduz em cativeiro (Sato et al., 2003; Costa et al., 2015). Possui desova parcelada, podendo ocorrer naturalmente em viveiros. São muito apreciados gastronomicamente por possuir carne saborosa e em termos de produção, apresentam rendimento cárneo em torno de 84% (Meurer et al., 2010). Os animais adultos podem atingir até 8 Kg de peso corpóreo e a espécie possui potencial para ser introduzida na aquicultura por suas características de larvicultura como a aceitação de alimento inerte, altos índices de sobrevivência, além da apreciação de sua carne e pressão de captura nos estoques naturais (Travassos, 1959; Sato & Godinho, 1988; Cardoso et al. 1996; Bazzoli e Godinho, 1997; Shibata, 2003). Apresentam melhor desempenho entre 27 e 28°C (Costa et al., 2014).

A fase de larvicultura é reconhecida como um período de maior complexidade na criação de peixes (Andrade & Yasui, 2003), e a do pacamã nos primeiros vinte dias está sujeita a situações que podem piorar a qualidade da água. Após a eclosão, as estruturas da desova como a capa gelatinosa espessa de adesão (Rizzo & Godinho, 2003), ovos

vazios e ovos não eclodidos se não forem removidos da água entrarão em decomposição piorando a qualidade da água e podendo elevar a concentração da amônia (Thurston & Russo, 1978). Ainda nos primeiros dias de vida, outras duas fases da criação podem ser marcadas por elevações deste poluente, na primeira com a redução do conteúdo do saco vitelino a partir do oitavo dia após a eclosão (Guimarães Cruz et al., 2009), as larvas passam a receber alimentação exógena em abundância para estimular o consumo e diminuir a competição entre as larvas (Duffy et al., 1996), contudo, parte desta dieta não é consumida. A outra etapa ocorre por volta dos vinte dias e é marcada pelo condicionamento alimentar em que as larvas são estimuladas a aceitar o alimento formulado através da transição do alimento natural para as rações comerciais (Cordeiro et al., 2015).

O emprego do sal comum na larvicultura e transporte (Gomes et al., 2003) de peixes de água doce vem sendo adotado no intuito de atenuar os efeitos decorrentes da intensificação empregada nos criatórios, como o aparecimento de doenças e enfermidades e estresse.

De acordo com a capacidade osmorregulatória, o pacamã é considerado uma espécie estenoalina por sobreviver em uma faixa estreita de salinidade na água (Luz & Santos, 2008a). Deste modo, avaliar o comportamento desta espécie em ambiente salobro, frente aos desafios previsíveis nesta fase de cultivo, torna-se necessário, pois a alteração da concentração iônica da água pode reduzir a sobrevivência e o crescimento dos peixes (Baldisserotto, 2013).

Uma das formas de se constatar o efeito tóxico gerado pela exposição a um contaminante se dá por meio do estudo com biomarcadores. Segundo Monserrat et al. (2007), os biomarcadores são medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou até

mesmo parâmetros comportamentais que indicam em termos bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes, sendo assim são tidos como importantes ferramentas de avaliação de contaminação em ambientes aquáticos.

Diversos estudos têm sido conduzidos utilizando a histopatologia como biomarcador, inclusive para estudos toxicológicos com compostos nitrogenados (Thurston et al., 1981; Manissery & Madhyastha, 1993; Banerjee & Bhattacharya, 1994; Benli et al., 2008). As alterações histopatológicas podem ser o resultado de mudanças bioquímicas e fisiológicas adversas em um organismo. Assim sendo, a histopatologia pode indicar rapidamente órgãos-alvo, tecidos, células e organelas que estejam afetadas e, em muitos casos, é possível distinguir lesões induzidas por tóxicos daquelas lesões provenientes de doenças infecciosas (Hinton & Laurén, 1990).

De acordo com Bernet et al. (1999), dentre os órgãos indicados para o estudo histopatológico em peixes, destacam-se principalmente as brânquias, expostas permanentemente a potenciais agentes tóxicos, o fígado e os rins, os quais possuem papéis essenciais no metabolismo, excreção e osmorregulação.

As brânquias realizam uma variedade de funções fisiológicas vitais incluindo a troca de gases, ionorregulação, manutenção do balanço ácido-base e excreção de compostos nitrogenados. As brânquias, por estarem em contato direto com o ambiente externo são o primeiro órgão atingido por poluentes, desenvolvendo lesões relacionadas às dificuldades respiratórias e osmorregulatórias (Evans et al., 2006), sendo um marcador que expressa de forma concreta a qualidade do meio circundante.

Segundo Mallatt (1985), o processo pelo qual as lesões branquiais causadas por poluentes ocorrerem, pode ser dividido em dois grupos, sendo o primeiro das lesões causadas pelo efeito deletério direto da substância onde predomina a necrose e ruptura

de epitélio cuja morte celular ocorre por autólise ou ação lítica do agente e, o segundo, pelas alterações desenvolvidas pelo peixe como defesa em resposta à substância deletéria. Neste caso, hipersecreção de muco, descolamento do epitélio, edema, hiperplasia, assim como outras, atuam como barreira na defesa do contato e absorção do poluente, mas que podem levar a asfixia do peixe por dificultar as trocas gasosas.

O estudo dos componentes do sangue e de suas funções é importante para o conhecimento das condições normais e patológicas, pois fornecem indícios de que o meio ambiente onde o peixe vive pode exercer alguma influência sobre o mesmo (Vázquez & Guerrero, 2007), interferindo em suas funções fisiopatológicas que podem afetar a homeostase, colaborando assim, no diagnóstico de condições adversas (Tavares-Dias et al., 1999).

O trauma associado com a exposição à amônia e ao nitrito ativa respostas fisiológicas, que terá efeito nos componentes do sangue. Níveis de íons, enzimas e células plasmáticas com funções metabólicas importantes podem ser indicativos da saúde geral do peixe (Palti et al., 2000). De acordo com Capen & Rosol (1989), a avaliação de análises dos componentes hematológico, bioquímico e imunológico do sangue auxilia a produção de peixes por facilitar a detecção precoce de doenças infecciosas e na identificação de condições subletais que estejam afetando o desempenho da produção.

De acordo com Peres et al. (2015), os tecidos danificados por intoxicação, doenças ou estresse de manejo, liberam enzimas na corrente sanguínea devido ao aumento da permeabilidade das membranas celulares modificando assim seus valores séricos normais e de outros metabólitos em respostas ao estresse que incluem mudanças, tais como: nos níveis de glicose plasmática (Staurnes et al., 1994), no hematócrito e

hemoglobina (Svobodová et al., 2005), níveis de lactato (Sinha et al., 2012), aspartato amino transferase, fosfatase alcalina (Peyghan & Azary-Takamy, 2002), proteínas totais, albumina (Peres et al., 2015), creatina fosfoquinase, ureia (Siikavuopio & Saether, 2006) e mudanças nas estruturas celulares e teciduais (Mallatt, 1985; Cardoso et al., 1996).

Testes agudos e crônicos com amônia e nitrito são usados para desenvolver critérios de padronização para o controle de suas respectivas concentrações nos sistemas aquáticos (Randall e Tsui, 2002), sobretudo em sistemas fechados e de altas densidades de estocagem. Além disso, segundo Peres et al. (2015), a hematologia e bioquímica sanguínea pode refletir o processo fisiológico do animal no ambiente em que vive.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., Elmenshawy, O.M. 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, **88**, 1028-1035.
- Andre, D.R.; Yasui, G.S. 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.166-172.
- Baldisserotto, B. 2003. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 2003.Santa Maria. UFSM, p249.
- Barbieri, E., Bondioli, A.C. 2015. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquaculture Research*, **46**, 565-571.
- Bazzoli, N., Godinho, H.P., 1997. Ovócitos vitelegênicos do surubim *Pseudoplatystoma coruscans* e do pacamã *Lophiosilurus alexandri*. In: Surubim. Org: M.O.T. Miranda IBAMA, Belo horizonte, 156pp.
- Benli, A.Ç.K., Köksal, G. 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae e fingerlings. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **29**, 339-344.
- 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.

- Boyd, C.E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Developments in aquaculture and fisheries science (9). *Elsevier Scientific Publishing Company*, 318 pp.
- Cardoso, E.L., Chiarini-Garcia, H., Ferreira, R.M.A., Poli, C.R. 1996. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. *Journal Fish Biology*, **49**, 778-787.
- Cordeiro, N.I.S., Costa, D.C., Silva, W. S., Takata, R., Miranda-Filho, K. C., Luz, R.K. 2016. High stocking density during larviculture and effect of size and diet on production of juvenile *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae) *Journal of Applied Ichthyology*, **32**, 61-66.
- Costa, D.P., Leme, F.O.P., Takata, R., Costa, D.C., Silva, W.S., Melillo Filho, R., Alves, G.M., Luz, R.K. 2014. Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juvenile of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. *Aquaculture Research*, 1-10.
- Costa, D.C., Silva, W. S., Melillo-Filho, R., Miranda-Filho, K.C., Santos, J.C.E., Luz, R.K. 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Animal Reproduction Science*, **54**,148-154.
- Costa, L.D.F., Miranda-Filho, K.C., Severo, M.P., Sampaio, L.A. 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. *Aquaculture*, **285**, 270-272.
- Duffy, J.T.; Epifanio, C.E.; Cope, J.S. 1996. Effects of prey density on the growth and mortality of weakfish *Cynoscion regalis* (Bloch Schneider) larvae: experiments in field enclosures. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* **202**, 191-203.
- El-Sayed, A-F.M. 2006. Tilapia culture. CABI Publishing, Oxfordshire, U.K., 277 pp.
- El-Shafai, S.A.; El-Gohary, F.A.; Nasr, F.A., Steen, N.P. 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, **232**, 117-127.
- Evans, J.J., Park, D., Brill, G.C., Klesius, P.H. 2006. Un-ionized Ammonia Exposure in Nile Tilapia: Toxicity, Stress Response, and Susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. *North American Journal of Aquaculture*, **68**, 23-33.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W. 1999. Ionic Transport in the Fish Gill Epithelium. *Journal of Experimental Zoology*, **283**, 641-652.
- Gomes, L.C., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A.R.M., Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Urbinati, E.C. 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **34**, 76-84.
- Grosell, M., Jensen, F.B. 2000. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology*, **50**, 97-107.
- Guimarães-Cruz, R.J.; Santos, J.E.; Sato, Y. et al. 2009. Early development stages of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces: Pseudopimelodidae) from the São Francisco River basin, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*. v.**25**, 321-327.



- Handy, R.D., Poxton, M.G. 1993. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **3**, 205-241.
- Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, **166**, 181-212.
- Israeli-Weinstein, D., Kimmel, E. 1998. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. *Aquaculture*, **165**, 81-93.
- Jensen, F.B. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, **135**, 9-24.
- Lewis, J.W.; Morris, D.P. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Transactions of the American Fisheries Society*, **115**, 183-195.
- Luz, R.K., Dos Santos, J.C.E. 2008a. Avaliação da tolerância de larvas de pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces: Siluriformes) a diferentes salinidades. *Acta Scientifica Biological Science*, **30**, 345-350.
- Luz, R.K., Dos Santos, J.C.E. 2008b. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **43**, 903-909.
- Luz, R.K., Portella, M.C. 2002. Larvicultura de trairão (*Hoplias lacerdae*) em água doce e água salinizada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **31**, 829-834.
- Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **42**, 630-646.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M. 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, **133**, 151-160.
- Meurer, F.; Oliveira, S.T.L.; Dos Santos, L. et al. 2010. Níveis de oferta de alimento vivo para alevinos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, **5**, n.1, 111-116.
- Miranda-Filho, K.C., Pinho, G.L.L., Wasielesky, W.J., Bianchini, A. 2009. Long-term ammonia toxicity to pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **150**, 377-382.
- Mommsen, T.P., Danulat, E., Walsh, P.J. 1992. Metabolic actions of glucagon and dexamethasone in liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta*. *General Comparative Endocrinology*, **85**, 316-326.
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Ghaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A. Pollution Biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. 2007. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **146**, 221-234.
- Moraes, G., Avilez, I.M., Hori, T.S.F. 2006. Comparison between biochemical responses of the teleost pacu and its hybrid tambacu (*Piraractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) to short term nitrite exposure. *Brazilian Journal of Biology*, **66**, 1103-1108.

- Ostrensky, A., Wasielesky, W.J. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, **132**, 339-347.
- Peres, B.H., Costas, B., Perez-Jimenez, A., Guerreiro, I., Oliveira Teles, A. 2015. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, **31**, 65-71.
- Peyghan, R., Azary-Takamy, G. 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.
- Piedras, S.R.N., Pouey, J.L.O.F., Moraes, P.R.R., Cardoso, D.F. 2006. Lethal concentration (CL<sub>50</sub>) of un-ionized ammonia for pejerrey larvae in acute exposure. *Scientia Agricola*, **63**, 184-186.
- Pillay, T.V.R. 2005. *Aquaculture Principles and Practices*. 2nd Ed. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, UK, 624p.
- Rand, G.M., Petrocelli, P.R. 1985. Introduction. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (Edited by Rand, G.M., Petrocelli, P.R.). Taylor & Francis, USA, **1**, 1-28.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, **45**, 17-23.
- Randi, A.S., Monserrat, J.M., Rodriguez, E.M., Romano, L.A. 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidar). *Journal of Fish Diseases*, **19**, 311-322.
- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacean. *Biological Reviews*, **62**, 1-24.
- Rizzo, E.; Godinho, H.P. 2003. Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Eds). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 115-132.
- Sampaio, L.A., Wasielesky, W., Miranda-Filho, K.C. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **68**, 668-674.
- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Nuñez, A.P.O. et al. 2003. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho, H.P.; Godinho, A.L. (Eds). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.229-274
- Siikavuopio, S.I., Saether, B.S. 2006. Effects of chronic nitrite exposure on growth in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, **255**, 351-356.
- Sinha, A.K., Liew, H.J., Marjan, D., Ronny, B., Gudrun, B. 2012. The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in gold fish (*Carassius auratus* L.) *Aquatic Toxicology*, **109**, 33-46.

- Small, B.C. 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture*, **238**, 469-481.
- Spotte, S. 1979. Seawater aquariums. London: John Wiley & Sons Ltd.
- Staurnes, M., Rainuzzo, J.R., Sigholt, T., Jørgensen, L. 1994. Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: stress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **109**, 413-421.
- 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.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Poleszczuk, G., Hůda, J., Hamáčková, J., Kroupová, H. 2005. Nitrite Poisoning of Fish in Aquaculture Facilities with Water-recirculating Systems. *Acta Veterinaria Brno*, **74**, 129-137.
- Thurston, R.V., Russo, R.C., Smith, C.E. 1978. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. *Transactions of the American Fisheries Society*, **107**, 361-368.
- Timmons, M., Ebeling, J. 2013. Recirculating aquaculture. 3ed, 788p.
- Tomasso, J.R. 1986. Comparative toxicity of nitrite to freshwater fishes. *Aquatic Toxicology*, **8**, 129-137.
- Tucker, C.S., Francis, F.R., Beale, M.H. 1989. Nitrite-induced anemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **34**, 295-301.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry Physiology, Part C*, **116**, 89-95.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Diamant, A., et al. 1993. Chronic toxicity of ammonia to juvenile seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. *Journal of Fish Biology*, **42**, 321-328.
- Walsh, P.J., Bergman, H.L., Narahara, A., Wood, C.M., Wright, P.A., Randall, D.J., Maina, J.N., Laurent, P. 1993. Effects of ammonia on survival, swimming, and activities of enzymes of nitrogen metabolism in the Lake Magadi tilapia *Oreochromis alcalicus grahami*. *Journal of Experimental Biology*, **180**, 323-387.
- Wilkie, M.P., Wood, C.M. 1996. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, **113**, 665-673.
- Zhang, L., Xiong, D.M., Zhao, Z.G., Fang, W., Yang, K., Fan, Q.X. 2012. Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Journal of Applied Ichthyology*, **28**, 82-86.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as respostas, fisiológica e comportamental, do pacamã *L. alexandri* quando exposto em ambientes ricos em amônia e nitrito.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar as concentrações medianas letais para amônia e nitrito em diferentes idades.

Verificar se a tolerância a estes compostos nitrogenados se modifica com o desenvolvimento ontogênico desta espécie.

Verificar se a salinidade influencia na tolerância aos compostos nitrogenados.

Verificar se a diferença de temperatura interfere na toxicidade dos compostos nitrogenados.

Determinar quais alterações bioquímicas (no sangue) e histológicas ocorrem após a intoxicação e desintoxicação em juvenis do pacamã.

Conhecer as alterações bioquímicas (no sangue) e histológicas que ocorrem em decorrência desta exposição e após a desintoxicação.

**ARTIGO 1****Toxicidade aguda em larvas de pacamã *Lophiosilurus alexandri* de diferentes idades expostas à amônia e ao nitrito em duas salinidades e três temperaturas**

Márcio José dos Santos Silva<sup>a</sup>, Franklin Fernando Batista da Costa<sup>a</sup>,

Rodrigo Takata<sup>b</sup>, Ronald Kennedy Luz<sup>a</sup>, Kleber Campos Miranda Filho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>b</sup> Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro-FIPERJ, Pç. Fonseca Ramos s/nº–Terminal Rodoviário Roberto Silveira, CEP 24030-020, Niterói, RJ.

Corresponding author:

Kleber Campos Miranda-Filho  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia  
Laboratório de Aquacultura - LAQUA  
Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte,  
MG, Brasil  
Phone: + 55 31 3409-3311  
E-mail: [kmiranda2010@ufmg.br](mailto:kmiranda2010@ufmg.br), [kleber08@gmail.com](mailto:kleber08@gmail.com)

## 1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância das larvas de pacamã *Lophiosilurus alexandri*, com 1 dia de vida ( $6,72 \pm 0,47$  mm;  $0,010 \pm 0,006$  g), larvas com sete dias de vida ( $12,18 \pm 0,93$  mm,  $0,021 \pm 0,002$  g) à toxicidade aguda ( $CL_{50-96h}$ ) com amônia e nitrito em diferentes salinidades e, em seguida, em larvas com idade de 20 dias ( $18,46 \pm 1,07$  mm;  $0,092 \pm 0,013$  g) nas temperaturas de  $25,80 \pm 0,17^\circ\text{C}$ ;  $29,07 \pm 0,22^\circ\text{C}$  e  $31,53 \pm 0,24^\circ\text{C}$  com 2‰ de salinidade. Para isto, as larvas foram divididas em grupos de 10 indivíduos e submetidas às concentrações crescentes destes tóxicos. Após 96 h de exposição à amônia, as  $CL_{50-96h}$  das larvas de 1 dia foram de 0,62 (NS= 0,06) mg/L N-NH<sub>3</sub> nos tratamentos sem a adição de sal na água e 0,59 (NS= 0,06) mg/L N-NH<sub>3</sub> na água com 2‰ de salinidade. Com sete dias de vida, as larvas em ambiente salobro foram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) mais tolerantes. As  $CL_{50-96h}$  estimadas foram de 1,11 (NS= 0,1) mg/L N-NH<sub>3</sub> em água doce e 1,74 (NS= 0,17) mg/L N-NH<sub>3</sub> em meio salobro e 3,06 (NS= 0,3) mg/L N-NH<sub>3</sub> em animais de 20 dias. O nitrito foi significativamente ( $P < 0,05$ ) mais tóxico em água doce,  $CL_{50-96h} = 170,39$  (NS= 17,0) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> do que para o ambiente salinizado  $CL_{50-96h} = 967,98$  (NS= 96,98) mg/L<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nas larvas de 1 dia e após sete dias de vida, com a  $CL_{50-96h}$  estimada em 234,05 (NS= 23,4) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e 405,97 (NS= 40,5) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> para os animais mantidos em ambiente salobro, mas a toxicidade aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) após 20 dias de vida com a  $CL_{50-96h} = 342,70$  (NS= 34,27) mg/L<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em ( $26^\circ\text{C}$ ). Nas três temperaturas testadas com NH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos e as  $CL_{50-96h}$  foram estimadas em 3,06 (NS= 0,3); 2,63 (NS= 0,26) e 3,66 (NS= 0,37) mg/L N-NH<sub>3</sub>. Já as  $CL_{50-96h}$  estimadas para o nitrito foram 342,70 (NS= 34,3); 347,49 (NS= 34,7) e 388,03 (NS= 38,8) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. A análise histopatológica constatou que as brânquias estavam em desenvolvimento e diferenciação tecidual. A

lesão mais encontrada foi descolamento de epitélio respiratório. Os resultados indicam que com a idade e em ambiente salobro, a larva do pacamã aumentou a tolerância para a amônia. A salinidade elevou a tolerância das larvas ao nitrito, mas esta diminuiu com o desenvolvimento da idade. Conclui se que a tolerância do pacamã aos compostos nitrogenados aumenta com o aumento da idade e do tamanho da larva e também em ambiente salinizado a 2‰. Neste estudo constatamos também que a toxicidade não se diferenciou nas três temperaturas testadas e os compostos nitrogenados mesmo em baixas concentrações podem causar a perda de 50% da população em um curto espaço de tempo.

Palavras chave: Compostos nitrogenados, piscicultura, qualidade da água, siluriforme.

## **2. INTRODUÇÃO**

A amônia e o nitrito são os principais poluentes encontrados na aquicultura conhecidos por causarem grandes perdas por mortalidades de peixes em sistemas de aquicultura intensiva (Sampaio et al., 2002; Jensen, 2003; Svobodová et al., 2005; Miron et al., 2008).

Tradicionalmente, o excesso destes poluentes é reduzido com renovações constantes de água (Bernet et al., 1999). No entanto, de acordo com Zhang et al. (2012) as tendências atuais dos órgãos de regulamentação ambiental, estão limitando as quantidades de água que podem ser consumidas e descartadas, diminuindo a viabilidade de se usar grandes volumes de água para diluir estes e outros poluentes acumuláveis.

A larvicultura dos peixes é conhecida como uma atividade delicada (López e Sampaio, 2000), pois nas fases iniciais de vida, os peixes costumam ser mais sensíveis (Luo et al., 2016) a alterações no ambiente.

Algumas estratégias são tomadas para minimizar as perdas de produtividade na aquicultura, tais como, o controle da temperatura da água, pois este fator abiótico influencia o metabolismo e sobrevivência de espécies pecilotérmicas como os peixes (Lermen et al., 2004; Costa et al., 2014; Takata et al., 2014). Outra medida adotada é a salinização da água de cultivo (Sampaio et al., 2002), pois manter as larvas de algumas espécies de peixes de água doce em ambiente salobro, vem apresentando resultados de sobrevivência e crescimento semelhantes ou superiores aos das larvas criadas em água doce (Luz e Santos, 2008; Santos e Luz, 2009). Essa estratégia também evita a perda de animais por parasitismo e doenças, no caso de seres estenoalinos. O sal também possibilita um maior tempo de vida para artêmias, que são muito usadas para a alimentação de larvas de peixes de água doce carnívoros. (Santos e Luz, 2009; Takata et al., 2014) Os íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) atuam como inibidor competitivo à toxicidade do nitrito (Jensen, 2003; Svobodová et al., 2005), reduzindo a perda iônica em casos de estresse como o causado pela amônia (Sampaio et al., 2002). De um modo geral, mudanças no ambiente, são conhecidas por causarem alterações celulares e teciduais, principalmente nas brânquias (Cardoso et al., 1996), que são órgãos multifuncionais em contato direto com a água, sendo desta forma utilizadas como órgão biomarcador em peixes (Bernet et al., 1999).

Acredita-se que o pacamã *L. alexandri*, um peixe brasileiro da ordem siluriforme, esteja entre as principais espécies cultiváveis com potencialidade para o aquarismo internacional (Santos e Luz, 2009) e também para o consumo humano (Tenório et al., 2006; Costa et al., 2015; Melillo Filho et al., 2016). Ele apresenta alto rendimento de carcaça e qualidade da carne (Luz e Santos, 2016). Por essas razões, estudos têm sido desenvolvidos com a referida espécie (Cardoso et al., 1996; López & Sampaio, 2000; Luz e Santos, 2008; Santos et al., 2013; Costa et al., 2015; Kitagawa et al., 2015; Souza



et al., 2015), no entanto, pouco se conhece sobre a tolerância desse peixe frente à intoxicação por compostos nitrogenados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância das larvas de pacamã à amônia e ao nitrito, em três fases larvais, sendo as primeiras fases em duas salinidades; e na terceira se a toxicidade destes compostos nitrogenados sofre influência em diferentes temperaturas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Toda metodologia empregada no presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de ética em experimentação animal (CETEA 70/2011).

O estudo foi conduzido no Laboratório de Aquacultura - LAQUA/UFMG, tendo como organismos-alvo, larvas de pacamã *L. alexandri*, com um dia de vida ( $6,72 \pm 0,47$  mm;  $0,010 \pm 0,006$  g), larvas com sete dias de vida ( $12,18 \pm 0,93$  mm;  $0,021 \pm 0,002$  g) e larvas com idade de 20 dias de vida ( $18,46 \pm 1,07$  mm;  $0,092 \pm 0,013$  g).

Os animais foram obtidos após a reprodução de peixes do laboratório de aquacultura por meio de desova natural de acordo com Costa et al. (2015). Da desova até o fim do experimento foi utilizada água de poço artesiano previamente aquecida em 28°C e aerada para manter a concentração de oxigênio dissolvido acima de 6 mg/L.

#### **3.1 Aclimação e pré-teste**

Para a realização dos testes, larvas de pacamã recém eclodidas e larvas com seis dias de vida foram divididas em 2 grupos. O primeiro grupo recebeu 0,5‰ de sal, a cada seis horas para a aclimação em 24 h, obtida por adição de sal marinho para aquarofilia (Beijing Redcoral Aquatech Co., China), até atingir a salinidade de 2‰, conforme relatado por Luz e Dos Santos (2008). O segundo grupo permaneceu em aclimação na condição de salinidade zero.

Para o segundo teste, as larvas de 20 dias de idade receberam a mesma aclimação à salinidade de 2‰ como nos testes anteriores e foram aclimatadas em banhos termostatizados em três condições distintas:  $25,80 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ ;  $29,07 \pm 0,22^{\circ}\text{C}$  e  $31,53 \pm 0,24^{\circ}\text{C}$  e em fotoperíodo de 12 h luz, com aeração constante.

A definição das concentrações de amônia e nitrito a serem testadas se deu por meio de testes toxicológicos agudos preliminares de 96 h. A partir do conhecimento da faixa letal de exposição dos peixes aos compostos nitrogenados foram iniciados os testes definitivos de toxicidade aguda (Tab. 1), sendo que todos os tratamentos foram realizados com réplica.

### **3.2 Análises físico-químicas da água**

Para todos os testes de toxicidade aguda foi realizado o monitoramento de algumas variáveis físico-químicas da água. A cada 24 h foram registrados, de todas as unidades experimentais, os dados de pH, temperatura, salinidade e condutividade elétrica, com pHmetro COMBO portátil (Hanna, modelo HI 98130) e o oxigênio dissolvido (OD) com o oxímetro portátil (Hanna, modelo HI 9146). Uma alíquota de 10 mL foi destinada à análise de nitrito em espectrofotômetro mono-feixe (HACH, modelo DR/2010) e 100 mL para análise de amônia com o eletrodo de íon seletivo (Hanna, modelo HI 4101) acoplado em um pHmetro de mesa (Hanna, modelo HI 253).

### **3.3 Testes de toxicidade aguda**

Os peixes foram mantidos em béqueres de vidro (1 L) em grupos de 10 indivíduos não excedendo 4 g/L (ABNT, 2016), a fim de evitar influência na densidade, concentração de metabólitos e consumo de oxigênio. Os béqueres foram mantidos em banho termostatizado e com aeração.

Tabela 1. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das concentrações testadas de amônia (N-NH<sub>3</sub>) e nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) em mg/L nas larvas de 24 h e sete dias de *Lophiosilurus alexandri* nas salinidades 0 e 2‰ em 96 horas (primeiro teste) e no segundo teste com larvas de 20 dias expostas a N-NH<sub>3</sub> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em mg/L em três temperaturas (25,80 $\pm$ 0,17; 29,07 $\pm$ 0,22; e 31,53 $\pm$ 0,24°C) em ambiente salobro (2‰).

Primeiro Teste								
Larvas	Concentrações de amônia (mg/L N-NH <sub>3</sub> )							
1 dia	0‰	0,06 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,49	1,1 $\pm$ 0,09	1,81 $\pm$ 0,0	2,77 $\pm$ 0,25		
	2‰	0,04 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,65	1,61 $\pm$ 0,17	3,10 $\pm$ 0,0		
sete dias	0‰	0,2 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,10	0,63 $\pm$ 0,20	1,27 $\pm$ 0,28	1,85 $\pm$ 0,40	2,26 $\pm$ 0,13	
	2‰	0,03 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,16	0,75 $\pm$ 0,19	2,08 $\pm$ 1,43	2,28 $\pm$ 0,61	2,62 $\pm$ 0,35	2,95 $\pm$ 0,05
Concentrações de nitrito (mg/L <sup>-1</sup> N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )								
1 dia	0‰	1,25 $\pm$ 1,9	74,5 $\pm$ 6,4	136,7 $\pm$ 24,7	290,0 $\pm$ 36	477,7 $\pm$ 83,1	620 $\pm$ 111,4	1200
	2‰	1,5 $\pm$ 0,7	185,3 $\pm$ 19,1	383,3 $\pm$ 80,4	565,3 $\pm$ 142,4	830	1000	1500
sete dias	0‰	0,17 $\pm$ 0,05	62,5 $\pm$ 9,57	278,33 $\pm$ 20,6	325 $\pm$ 57,74	450 $\pm$ 67,7	650 $\pm$ 74,3	1100
	2‰	0,25 $\pm$ 0,05	157,5 $\pm$ 27,5	342,5 $\pm$ 11,5	400	600	950 $\pm$ 71,4	
Segundo Teste								
Larvas de 20 d	Concentrações de amônia (mg/L <sup>-1</sup> N-NH <sub>3</sub> )							
	0,24 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,08	1,98 $\pm$ 0,29	3,85 $\pm$ 0,44	11,2 $\pm$ 1,8	18,72 $\pm$ 1,3		
Concentrações de nitrito (mg/L <sup>-1</sup> N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )								
	0,67 $\pm$ 1,23	143,57 $\pm$ 12,15	330,77 $\pm$ 46,1	593,33 $\pm$ 75,5	751 $\pm$ 63,89	1132		

Após o período de aclimação, 100% da água de todos os béqueres foi renovada por 1 L de água limpa, previamente aquecida e oxigenada respeitando a salinidade da aclimação, e receberam as concentrações de cloreto de amônio e nitrito de sódio (obtidas a partir de soluções estoques de 20 g/L de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e 10 g/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Tab. 1).

Renovações totais dos meios experimentais foram feitas diariamente configurando um modelo de exposição semi-estático, ao longo das 96 h dos testes. Os animais mortos (sem movimento observável) foram retirados dos recipientes e as mortalidades foram registradas em planilha. Os peixes não foram alimentados durante os testes de toxicidade aguda com o objetivo de se manter a integridade do ambiente experimental. Importante salientar que foi mantido um controle com salinidade de 6,6‰ semelhante à salinidade da maior concentração de nitrito testada para acompanhar o efeito do sal na sobrevivência dos animais testados.

### **3.4 Análises histológicas**

Uma amostra de 4 larvas por réplica foi fixada em líquido de Bouin por 12 h e transferida para álcool etílico 70%, em seguida submetida a processamento histológico e coloração por hematoxilina e eosina para avaliação histológica.

### **3.5 Análise estatística e tratamento dos dados**

Os dados obtidos das variáveis físico-químicas foram analisados estatisticamente, mediante observações de normalidade e homocedasticidade das variâncias, sendo então empregado ANOVA uma-via e quando verificada diferença significativa foi utilizado o teste a posteriori de Tukey a 5% de probabilidade.

As concentrações letais medianas (CL<sub>50</sub>) e os intervalos de confiança (95%) foram estimados para NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e amônia (amônia total - AT e amônia não ionizada ou gasosa - NH<sub>3</sub>) de acordo com os dados de mortalidade durante as 96 h de exposição, empregando o programa “Trimmed Spearman Karber method” (Hamilton et al., 1977) e o nível de segurança (NS) conforme descrito por Sprague (1971).

Tabela 2. Médias ( $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos: salinidade (S), temperatura (T), pH, oxigênio dissolvido (OD), percentual de saturação do OD ( $O_2$ Sat), em 96 h de exposição nos testes de toxicidade aguda com amônia e nitrito com larvas de pacamã *Lophosilurus alexandri* com 24 h e sete dias após de idade em 2 salinidades (Primeiro teste) e larvas de 20 dias na salinidade de 2‰, em 3 temperaturas (Segundo teste).

Primeiro Teste						
	Tratamento	S (‰)	T (°C)	pH	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> Sat (%)
<b>Exposição à amônia (N-NH<sub>3</sub>)</b>						
<b>Larva 1d</b>	<b>0‰</b>	0,22 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	26,61 $\pm$ 0,37	8,24 $\pm$ 0,07	6,20 $\pm$ 0,63	84,07 $\pm$ 7,86
	<b>2‰</b>	1,94 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	26,7 $\pm$ 0,52	8,23 $\pm$ 0,06	6,14 $\pm$ 0,66	83,09 $\pm$ 8,14
<b>Larva 7d</b>	<b>0‰</b>	0,14 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	26,42 $\pm$ 0,17	8,20 $\pm$ 0,01	6,37 $\pm$ 0,08	88,32 $\pm$ 0,88
	<b>2‰</b>	2,07 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	26,6 $\pm$ 0,13	8,34 $\pm$ 0,06	6,43 $\pm$ 0,06	88,44 $\pm$ 2,89
<b>Exposição ao nitrito (N-NO<sub>2</sub>)</b>						
<b>Larva 1d</b>	<b>0‰</b>	1,33 $\pm$ 1,19	26,80 $\pm$ 0,71	8,41 $\pm$ 0,07	6,83 $\pm$ 0,38	95,01 $\pm$ 4,06
	<b>2‰</b>	3,86 $\pm$ 1,42	27,18 $\pm$ 0,77	8,44 $\pm$ 0,07	6,64 $\pm$ 0,52	91,43 $\pm$ 4,76
<b>Larva 7d</b>	<b>0‰</b>	1,50 $\pm$ 1,36	26,23 $\pm$ 0,46	8,86 $\pm$ 0,13	6,88 $\pm$ 0,14	95,87 $\pm$ 1,73
	<b>2‰</b>	3,67 $\pm$ 1,40	25,92 $\pm$ 0,36	8,85 $\pm$ 0,05	6,77 $\pm$ 0,14	93,71 $\pm$ 1,46
<b>Exposição à amônia (N-NH<sub>3</sub>)</b>						
<b>Larva 20 d</b>	<b>26°C</b>	2,09 $\pm$ 0,01	25,83 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	8,09 $\pm$ 0,05	6,62 $\pm$ 0,07	92,05 $\pm$ 0,39
	<b>29°C</b>	2,09 $\pm$ 0,04	29,08 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	8,16 $\pm$ 0,05	6,51 $\pm$ 0,08	90,99 $\pm$ 0,32
	<b>32°C</b>	2,14 $\pm$ 0,02	31,35 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	8,22 $\pm$ 0,06	6,08 $\pm$ 0,14	90,74 $\pm$ 1,60
<b>Exposição ao nitrito (N-NO<sub>2</sub>)</b>						
<b>Larva 20 d</b>	<b>26°C</b>	3,41 $\pm$ 1,48	25,67 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	8,43 $\pm$ 0,08	7,58 $\pm$ 0,42	105,97 $\pm$ 4,72
	<b>29°C</b>	3,36 $\pm$ 1,37	28,89 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	8,37 $\pm$ 0,15	7,28 $\pm$ 0,46	104,81 $\pm$ 6,12
	<b>32°C</b>	3,52 $\pm$ 1,47	31,08 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	8,36 $\pm$ 0,13	7,07 $\pm$ 0,42	104,65 $\pm$ 5,73

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) para o mesmo teste com o mesmo composto nitrogenado (Teste Tukey), nas diferentes temperaturas.

#### 4. RESULTADOS

Os parâmetros físico químicos da água (Tab. 2) foram semelhantes aos praticados no cultivo desta espécie (Cardoso et al., 1996; López & Sampaio, 2000; Dos Santos & Luz, 2009; Takata et al., 2014; Costa et al., 2015).

Após 96 h de exposição à amônia, as  $CL_{50}$  (Tab. 3) das larvas de 24 h foram estimadas em: 0,62 mg/L N-NH<sub>3</sub> (NS= 0,06), para os tratamentos sem a adição de sal na água e em 0,59 mg/L N-NH<sub>3</sub> (NS= 0,06) na água com salinidade de 2‰.

Animais com sete dias de vida, em ambiente salobro foram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) mais tolerantes quando comparadas com as larvas de 24 h (Tab. 4). As  $CL_{50}$  estimadas foram de: 1,11 mg/L N-NH<sub>3</sub> (NS= 0,1), em água doce e de 1,74 mg/L N-NH<sub>3</sub> (NS= 0,17), em meio salobro.

O nitrito foi significativamente ( $P < 0,05$ ) mais tóxico para as larvas em água doce,  $CL_{50-96h} = 170,39$  mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (NS= 17,0), do que para o ambiente salinizado  $CL_{50-96h} = 967,98$  mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (NS= 96,98). Nossos resultados revelaram que a idade não influenciou na tolerância ao nitrito, diferente da salinidade ( $P < 0,05$ ), pois após sete dias de vida, a  $CL_{50-96h}$  foi estimada em 234,05 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (NS= 23,4), na água doce e em 405,97 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (NS= 40,5), para os animais mantidos em ambiente salobro.

Nas três temperaturas testadas com NH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos testados (Tab. 4), e as  $CL_{50-96h}$  foram estimadas em 3,06 (NS= 0,3); 2,63 (NS= 0,26) e 3,66 (NS= 0,37) mg/L N-NH<sub>3</sub>.

Já as  $CL_{50-96h}$  para o nitrito foram estimadas em: 342,70 (NS= 34,3); 347,49 (NS= 816 34,7) e 388,03 (NS= 38,8) mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Os resultados indicam que com a idade e em ambiente salobro, a larva do pacamã aumentou a tolerância para a amônia conforme os níveis de segurança observados (Tab. 4.). A salinidade elevou a tolerância das larvas ao nitrito, mas esta diminuiu com o desenvolvimento da idade.

Os resultados obtidos do estudo histológico apontaram que as brânquias nas larvas de 24 h apresentavam-se em desenvolvimento, com proliferação de células na região apical das lamelas (Fig. 1A a 1D). Um número maior de mortalidades foi observado já nas primeiras 24 h de exposição ao tratamento de 2,77 mg/L N-NH<sub>3</sub>, que estava com salinidade zero, porém em comparação ao grupo 3,10 mg/L N-NH<sub>3</sub> com salinidade de 2‰, foi possível notar que o teste foi finalizado com um número maior de

sobreviventes. As lesões como descolamento de epitélio só foram observadas no fim das 96 h de exposição, quando a brânquia já estava mais desenvolvida nos indivíduos expostos a 1,1 e 0,93 mg/L N-NH<sub>3</sub>.

Tabela 3. Concentrações letais medianas (CL<sub>50</sub>96 h) e intervalos de confiança (IC) em mg/L nos testes agudo com amônia e nitrito em larvas de um e sete dias em 2 salinidades (0 e 2‰) e larvas de vinte dias em 3 temperaturas.

		Exposição à amônia (N-NH <sub>3</sub> )			
Idade		24h	48h	72h	96h
Larva 1h	0‰	1,92 <sup>a</sup> (IC=1,69-2,20)	1,68 <sup>b</sup> (IC=1,41-2,01)	1,31 <sup>a</sup> (IC=1,0-1,71)	0,62 <sup>a</sup> (IC=0,41-0,94)
	2‰	1,88 <sup>a</sup> (IC=1,64-2,16)	1,21 <sup>a</sup> (*)	1,14 <sup>a</sup> (IC=0,99-1,31)	0,59 <sup>a</sup> (IC=0,43-0,82)
Larva 7d	0‰	2,10 <sup>a</sup> (IC=2,04-2,16)	1,60 <sup>ab</sup> (IC=1,53-1,68)	1,54 <sup>a</sup> (IC=1,44-1,64)	1,11 <sup>a</sup> (IC=0,98-1,25)
	2‰	2,78 <sup>b</sup> (*)	2,45 <sup>c</sup> (IC=2,39-2,50)	2,30 <sup>b</sup> (IC=2,23-2,37)	1,74 <sup>b</sup> (IC=1,53-1,98)
		Exposição ao nitrito (N-NO <sub>2</sub> -)			
Larva 1d	0‰	990,31 <sup>ns</sup> (IC=968,86-1012,23)	704,93 <sup>b</sup> (634,05-783,7)	416,69 <sup>a</sup> (IC=350,90-494,83)	170,39 <sup>a</sup> (IC=147,95-196,24)
	2‰	(**)	1224,74 <sup>c</sup> (*)	1066,76 <sup>b</sup> (IC=980,25-1160,9)	967,98 <sup>c</sup> (IC=880,68-1063,9)
Larva 7d	0‰	916,94 <sup>ns</sup> (IC=770,49-1091,22)	273,71 <sup>a</sup> (223,88-334,65)	255,98 <sup>a</sup> (211,45-309,89)	234,05 <sup>a</sup> (IC=196,77-278,39)
	2‰	792,11 <sup>ns</sup> (719,74-871,76)	585,57 <sup>b</sup> (511,61-670,24)	563,45 <sup>a</sup> (485,63-653,74)	495,97 <sup>b</sup> (417,89-588,63)
		Exposição à amônia (N-NH <sub>3</sub> )			
Larva 20 d	25,8°C	6,99 <sup>ns</sup>	6,68 <sup>ns</sup> (6,11-7,31)	5,31 <sup>ns</sup> (4,40-6,41)	3,06 <sup>ns</sup> (2,52-3,71)
	29,07°C	7,32 <sup>ns</sup> (6,56-8,17)	6,54 <sup>ns</sup> (*)	4,55 <sup>ns</sup> (3,51-5,90)	2,63 <sup>ns</sup> (2,27-3,05)
	31,53°C	7,55 <sup>ns</sup> (6,42-8,89)	5,51 <sup>ns</sup> (4,98-6,11)	5,36 <sup>ns</sup> (4,77-6,02)	3,66 <sup>ns</sup> (3,07-4,36)
		Exposição ao nitrito (N-NO <sub>2</sub> -)			
Larva 20 d	25,8°C	400,03 <sup>ns</sup> (379,40-421,78)	354,62 <sup>ns</sup> (315,18-398,99)	342,70 <sup>ns</sup> (300,88-390,33)	342,70 <sup>ns</sup> (300,88-390,33)
	29,07°C	457,87 <sup>ns</sup> (425,05-493,22)	382,41 <sup>ns</sup> (345,56-423,20)	356,37 <sup>ns</sup> (327,22-388,13)	347,49 <sup>ns</sup> (311,23-387,98)
	31,53°C	469,75 <sup>ns</sup> (437,79-505,04)	405,40 <sup>ns</sup> (388,81-422,69)	392,88 <sup>ns</sup> (354,80-435,05)	388,03 <sup>ns</sup> (352,40-427,26)

Valores de CL<sub>50</sub> seguidos por letras diferentes na mesma coluna para o mesmo teste e com o mesmo composto nitrogenado são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) após ANOVA uma via seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (\*) Não calculável; (\*\*\*) Não houve mortalidades (<sup>ns</sup>) não significativo.

A exposição ao  $\text{NO}_2^-$  nas primeiras 24 h causou mortalidade apenas na maior concentração (1200 mg/L) com salinidade 0‰ (Fig. 1G). No período de 48 h foram constatadas mortalidades em 1500 mg/L N- $\text{NO}_2^-$  na condição de 2‰ (Fig. 1H). Com 96 h, as brânquias ainda em desenvolvimento (larvas 24 h) já apresentavam descolamento de epitélio respiratório mais evidente em 136,7 e 383,3 mg/L nas salinidades 0 e 2 ‰, respectivamente.

Tabela 4. Níveis de segurança (NS) para as larvas de *Lophiosilurus alexandri* de acordo com Sprague, (1971), após 96 h de exposição à amônia e ao nitrito em diferentes idades em duas salinidades.

Idade	Exposição à amônia (N-NH <sub>3</sub> )		Exposição ao nitrito (N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	
	0‰	2‰	0‰	2‰
24 h	0,06 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	17,03 <sup>a</sup>	96,79 <sup>d</sup>
7 d	0,11 <sup>ab</sup>	0,17 <sup>b</sup>	23,40 <sup>ab</sup>	49,59 <sup>c</sup>
20 d (*)		0,30 <sup>c</sup>		34,27 <sup>bc</sup>

Valores de NS seguidos por letras diferentes com o mesmo composto nitrogenado são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) após ANOVA uma via seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (\*) valores da exposição em 26°C.

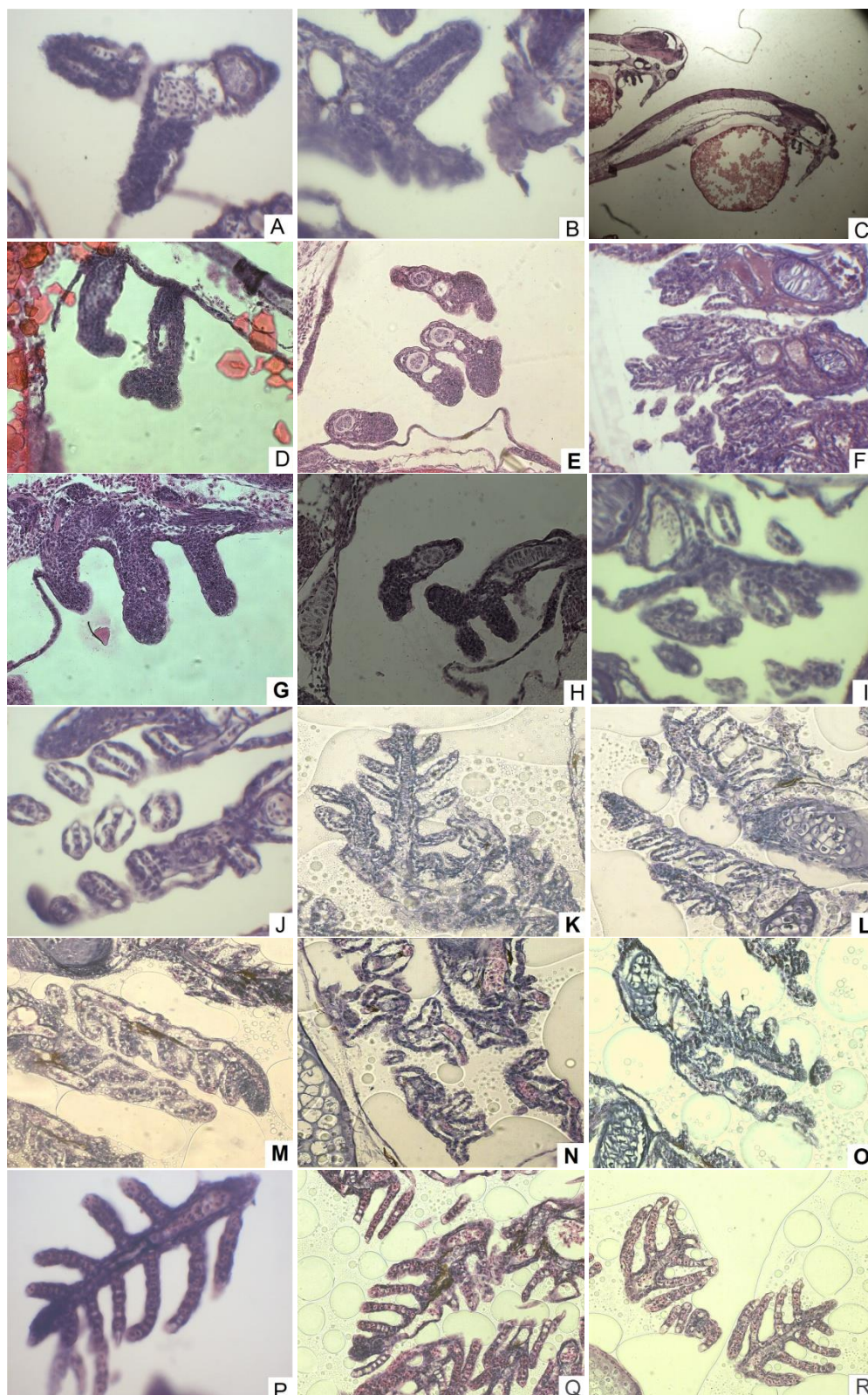
As larvas com sete dias de vida na água doce e na água salinizada a 2‰ apresentaram maiores médias de  $\text{CL}_{50}$  de nitrito no tempo de 24 h, em comparação com os demais tempos. Em ambas as salinidades não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tempos de 48-96 h. As médias de  $\text{CL}_{50}$  de nitrito foram superiores na salinidade de 2 nos tempos de 24-96 h (Tabela 4).

Os resultados obtidos do estudo histológico apontaram que as brânquias nas larvas de 24 h apresentavam-se em desenvolvimento, com proliferação de células na região apical das lamelas (Fig. 1A a 1D). Um número maior de mortalidades foi observado já nas primeiras 24 h de exposição ao tratamento de 2,77 mg/L N-NH<sub>3</sub>, que estava com salinidade zero, porém em comparação ao grupo 3,10 mg/L N-NH<sub>3</sub> com salinidade de



2‰, foi possível notar que o teste foi finalizado com um número maior de sobreviventes. As lesões como descolamento de epitélio só foram observadas no fim das 96 h de exposição, quando a brânquia já estava mais desenvolvida nos indivíduos expostos a 1,1 e 0,93 mg/L N-NH<sub>3</sub>.

A exposição ao NO<sub>2</sub><sup>-</sup> nas primeiras 24 h causou mortalidade apenas na maior exposição (1200 mg/L) com salinidade 0‰ (Fig. 1G). No período de 48 h foram constatadas mortalidades em 1500 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> na condição de 2‰ (Fig. 1H). Com 96 h, as brânquias ainda em desenvolvimento (larvas 24 h) já apresentavam descolamento de epitélio respiratório mais evidente em 136,7 e 383,3 mg/L nas salinidades 0 e 2 ‰, respectivamente.



Fotomicrografias de brânquias em larvas de *Lophiosilurus alexandri* com um dia, sete dias e vinte dias de vida, expostas por 96 h a amônia e ao nitrito. (A) larva de um dia de vida, salinidade 0‰, controle do teste de  $\text{NO}_2^-$ , aumento: 400x; (B) controle do teste com  $\text{NO}_2^-$  exibindo o desenvolvimento das lamelas secundárias após 96h em 2‰, 400x; (C) e (D) larva inteira de um dia e e detalhe da brânquia exposta a 2,77 mg/L N- $\text{NH}_3$ , 0‰, 40x (larva inteira) e

detalhe da brânquia, 400x, respectivamente; (E) larva de 24 h de vida exposta por 12 h a 3,10 mg/L N-NH<sub>3</sub>, 2‰, 400x; (F) brânquia de larva um dia de vida após 96 h exposição a 0,93 mg/L N-NH<sub>3</sub>, 2‰, desenvolvimento de lamelas secundárias, 400x; (G) brânquia de larva 24 h de vida após 24 h exposição a 1200 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 0‰, 400x; (H) brânquia de larva de um dia, após 48 h de exposição a 1500 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 2‰, 400x; (I) brânquia de larva de um dia, após 96 h exposição a 136 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 0‰, deslocamento de epitélio respiratório, 400x; (J) brânquia de larva de um dia, com deslocamento de epitélio, após 96 h em 383 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 2‰, 400x; (K) controle de larva sete d em 2‰, 400x; (L) descolamento de epitélio em larva de sete d, após 72 h de exposição a 0,63 mg/L N-NH<sub>3</sub>, 0‰, 400x; (M) descolamento de epitélio em larva de sete d na concentração 0,75 mg/L N-NH<sub>3</sub> por 96 h, 2‰, 400x; (N) larva de sete d com descolamento de epitélio após 96 h a 62,5 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 0‰, 400x; (O) brânquia de larva sete d mantida por 96 h a 157,5 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 2‰, 400x; (P) larva de vinte d, tratamento controle após 96 h em 26°C, 400x; (Q) brânquia de larva vinte d após 96 h de exposição a 3,85 mg/L N-NH<sub>3</sub>, 29°C, 400x; (R) brânquia de larva, vinte d após 96 h no tratamento 330 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 32°C, 400x. Todo material biológico corado em H.E.

Após sete dias de vida já foi possível identificar a estrutura conjuntiva do arco branquial recoberta por tecido epidérmico com a presença de vasos interlamelares preenchidos por eritrócitos (Fig. 1K). Também foram identificadas as lamelas secundárias com as células epiteliais, basais e eritrócitos. A histopatologia identificada nas larvas expostas às concentrações maiores que 0,63 e 0,75 mg/L N-NH<sub>3</sub>, após 72 h (Fig. 1L e 1M) e a 62,5 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, foi o descolamento de epitélio respiratório nas lamelas secundárias, mas esta lesão não foi observada nas larvas expostas a 157,5 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Fig. 1N e 1O).

Com vinte dias pós eclosão, as estruturas das brânquias já estavam formadas (Fig. 1P) e, as alterações como hiperplasia e descolamento de tecido respiratório, estavam mais evidentes após 24 h de exposição nos tratamentos acima de 3,85 mg/L N-NH<sub>3</sub> e 330mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(Fig. 1Q e 1R), nas três temperaturas testadas.

## 5. DISCUSSÃO

Os testes de toxicidade aguda são uma ferramenta importante nas fases iniciais da criação de peixes, pois ajudam os pesquisadores a compreender o quão sensível uma espécie é a agentes estressores como a amônia e o nitrito (Zhang et al., 2012).

A excreção dos animais, juntamente com a decomposição do alimento não consumido elevam a concentração de amônia no ambiente e conseqüentemente a de nitrito pelo processo de nitrificação levando a intoxicação, deformidade das larvas (Jensen, 2003), retardo no crescimento e mortalidades, como observaram Luo et al. (2016). De acordo com Cardoso et al. (1996), estabelecer o limiar tóxico para uma cultura intensiva é fundamental para o sucesso da atividade.

Neste estudo, os testes de toxicidade aguda também foram úteis para avaliar a susceptibilidade dos animais com relação à salinidade e à temperatura e à fase de desenvolvimento ontogenético e tamanho dos peixes. Os dados apresentados neste estudo corroboraram com a pesquisa realizada por Cardoso et al. (1996), com larvas e juvenis desta mesma espécie.

De acordo com Zhang et al. (2012), quando as concentrações da amônia na água se elevam, as concentrações no plasma do peixe, assim como, de outros tecidos como brânquias, fígado, cérebro músculo e rim também se elevam pela redução da difusão deste gás pelo gradiente de concentração entre o peixe e a água circundante. Como consequência, o pH do sangue se eleva reduzindo as atividades enzimáticas resultando em desestabilidade de organelas levando a danos teciduais (Das et al., 2004). Neste caso, salinizar a água pode diminuir a perda de íons do peixe para a água pela redução do gradiente iônico (Luz e Santos, 2008).

De acordo com Svobodová et al. (2005), a toxicidade do nitrito em peixes varia consideravelmente e depende de fatores como o tamanho, idade e espécie do peixe, além dos fatores relacionados à qualidade da água (como pH, temperatura, oxigênio, e concentração de cátions e ânions). O nitrito é absorvido oxidado de forma reversível a molécula de ferro ferroso a ferro férrico na metaloproteína hemoglobina do sangue em

metahemoglobina que é incapaz de se ligar ao oxigênio causando hipóxia e morte do peixe (Jensen, 2003).

Como os peixes de água doce são hiperosmóticos em relação ao meio circundante, eles apresentam elevada taxa de captação de íons monovalentes como os cloretos (Cl<sup>-</sup>). Deste modo, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é absorvido causando intoxicação. A tolerância das larvas ao nitrito foi maior devido ao aumento da salinidade na água. Acredita-se que tal fato se deve à competição pelos sítios de ligação e absorção entre os referidos íons (Svobodová et al., 2005). Desta forma, a estratégia, de se aumentar a salinidade da água, é uma forma diminuir a toxicidade do nitrito por inibição competitiva (Shinn et al., 2013).

A temperatura da água é um dos fatores abióticos que mais influencia a sobrevivência e o desenvolvimento ontogenético das larvas de pacamã (Takata, et al., 2014) Da mesma forma, essa variável gerou alterações no metabolismo e no crescimento de *L. alexandri*, como fora retratado por Costa et al. (2014). Tais efeitos podem ocorrer como reflexo da interferência da temperatura nas propriedades catalíticas de enzimas (Lermen et al., 2004). Contudo, as temperaturas testadas no presente estudo, não influenciaram na toxicidade aguda dos compostos nitrogenados sobre os exemplares de *L. alexandri*. De acordo com Randall e Tsui (2002), temperaturas entre 3 e 30°C causam pouca diferença na toxicidade da amônia em espécies de água doce, assim como, o intervalo entre 22 e 30°C não apresenta diferença significativa na toxicidade do nitrito (Kroupova et al., 2005).

O uso de indicadores bioquímicos, fisiológicos ou histológicos, tem sido adotado como biomarcadores (de exposição ou efeito) de produtos químicos xenobióticos (Bernet et al., 1999; Svobodová et al., 2005). As brânquias são conhecidas como o primeiro órgão a sofrer impacto direto da exposição aos poluentes (Miron et al., 2008).

No presente trabalho, foi possível detectar que a tolerância à amônia e ao nitrito aumentou com o desenvolvimento das larvas e também com o aumento da salinidade da água. Este fato pode ser atribuído ao desenvolvimento de órgãos importantes nos processos osmorregulatórios como as brânquias e rins (Luz e Dos Santos, 2008).

Os arcos brânquiais do *L. alexandri* foram detectados por Cruz (2007), no terceiro dia após eclosão. Já Cardoso et al. (1996) verificaram que após dez dias de eclosão, as larvas já apresentavam as brânquias totalmente desenvolvidas. O desenvolvimento deste órgão pode estar relacionado com o aumento da tolerância das larvas de pacamã frente à intoxicação dos compostos nitrogenados testados.

De acordo com Bernet et al. (1999), as alterações histológicas aparecem como respostas de médio prazo a estressores subletais, e a histologia fornece um método rápido para detectar o efeito de compostos considerados irritantes. As lesões observadas também foram descritas por Cardoso et al. (1996) estudando o efeito da amônia em juvenis do pacamã. Os referidos autores também encontraram hipertrofia das células mucosas, aumento de secreção de muco e desorganização e ruptura do epitélio lamelar. Miron et al. (2008) avaliaram os efeitos da amônia e do pH causados no jundiá *Rhamdia quelen* e associaram estas lesões ao comprometimento funcional da superfície das lamelas secundárias nas trocas gasosas, impedindo a função respiratória. Lease et al. (2003) relataram a importância íon regulatória das brânquias ao encontrar lesões semelhantes às descritas, além de hipertrofia de células mucosas do peixe “Lost River sucker” *Deltistes luxatus* quando exposto à intoxicação por amônia durante 30 dias.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a tolerância do pacamã aos compostos nitrogenados foi maior com o aumento da idade e do tamanho das larvas, e em ambiente salinizado a 2%. Neste

estudo constatamos também que a toxicidade não se diferenciou nas três temperaturas testadas, e os compostos nitrogenados, mesmo em baixas concentrações, podem causar a perda de 50% da população em um curto espaço de tempo.

## 7. REFERÊNCIAS

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-34.
- Cardoso, E.L., Chiarini-Garcia, H., Ferreira, R.M.A., Poli, C.R. 1996. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. *J. Fish Biol.* 49, 778-787.
- Costa, D.C.C., Souza e Silva, W., Melillo Filho, R. Miranda Filho, K.C., Dos Santos, J.C.E. 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 148-154,
- Cruz, R.J.G. 2007. História de vida inicial de *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces:Siluriformes). 2007. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) -Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K., Das, B.K. 2004. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (HamiltonHamilton). *Aquacult. Res.* 35, 134–143.
- Garcia, L.O., Braun, N., Becker, A.G., Loro, V.L., Baldisserotto, B. 2012. Ammonia excretion at different life stages of silver catfish. *Acta Scient.* 34 (1), 15-19.
- Jensen, F.B. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 135A, 9-24.
- Kitagawa, A.T., Costa, L. S., Paulino, R. R., Luz, R.K., Rosa, P.V., Guerra-Santos, B., Fortes-Silva, R. 2015. Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*) *Appl. Anim. Behav. Sci.* 171,211-218.

- Kroupova, H., Machova, J., Svobodova, Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Vet. Med.* 11, 461-471.
- Lease, H.M., Hansen, J.A., Bergman, H.L., Meyer, J.S. 2003. Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations. *Comp. Biochem. Physiol* 134C, 491-500.
- Lermen, C.L., Lappe, R., Crestani, M., Vieira, V.P., Gioda, C.R., Schetinger, M.R.C., Baldisserotto, B., Moraes, G., Morsch, V.M. 2004. Effect of diferente temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 239, 497-507.
- López, C.M., Sampaio, E.V. 2000. Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório. *Acta Scient.* 22 (2), 491-494,
- Luo, S., Wu, B., Xiong, X., Wang, J. 2016. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to early life stages of the rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (6), 1422-1427.
- Luz, R.K., Santos, J.C.E. 2008. Avaliação da tolerância de larvas do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces: Siluriformes) a diferentes salinidades. *Acta Sci. Biol. Sci.* 30 (4), 345-350.
- Luz, R.K., Santos, J.C.E., 2016. Reprodução e larvicultura do pacamã, chapter 22, in: Tavares-Dias, M., Mariano, W.S. (Eds.), *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*, Vol. 2. São Carlos: Pedro & João Editores, pp. 545-578.
- Miron, D.S., Moraes, B., Becker, G.A., Crestani, M., Spanevello, R., Loro, V.L., Baldisserotto, B. 2008. Ammonia end pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) *Aquaculture*, 277, 192-196,
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17-23.
- Sampaio, L.A.; Wasielesky, W.; Miranda-Filho, K.C. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil planatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 668-674.
- Santos, H.B., Sampaio, E.V., Arantes, F.P., Sato, Y. 2013. Induced spawning and reproductive variables of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae) *Neotr. Ichthyol.* 11, 607-614.



- Santos, J.C.E., Luz, R.K. 2009. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture*. 287, 324-328.
- Shinn, C. Marco, A., Serrano, L. 2013. Influence of low levels of water salinity on toxicity of nitrite to anuran larvae. *Chemosphere* 92, 1154-1160,
- Sprague, J.B. 1971. Measurement of pollutant to fish –III Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res.* 5, 245-266,
- 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. *Aquacult. Res.* 36, 1177-1184.
- Takata, R., Souza e Silva, W., Costa, D.C. Melilo Filho, R., Luz, R.K. 2014. Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. *Neotr. Ichthyol.* 12 (4), 853-859.
- Zhang, B.L.; Xiong, D.M., Li, B. Zhao, Z.G., Frang, W., Yang, K., Fran, Q-X. 2012. Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) J. *Appl. Ichthyol.* 28, 82-86.

**ARTIGO 2****Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri*  
exposed to ammonia and nitrite**

Márcio José dos Santos Silva<sup>a</sup>, Franklin Fernando Batista da Costa<sup>a</sup>, Fabiola Paes Leme<sup>b</sup>, Rodrigo Takata<sup>c</sup>, Deliane Cristina Costa<sup>a</sup>, Cristiano Campos Mattioli<sup>a</sup>, Ronald Kennedy Luz<sup>a</sup>, Kleber Campos Miranda Filho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>c</sup> Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro-FIPERJ, Pç. Fonseca Ramos s/nº–Terminal Rodoviário Roberto Silveira, CEP 24030-020, Niterói, RJ.

Corresponding author:

Kleber Campos Miranda-Filho  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia  
Laboratório de Aquacultura - LAQUA  
Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte,  
MG, Brasil  
Phone: + 55 31 3409-3311  
E-mail: [kmiranda2010@ufmg.br](mailto:kmiranda2010@ufmg.br), [kleber08@gmail.com](mailto:kleber08@gmail.com)

**ABSTRACT**

This study aimed to elucidate the responses of the Neotropical fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite, following a period of recovering. Acute toxicity tests lasted 96 h, subchronic toxicity tests lasted eight days and the detoxification trial lasted four days. Groups of 12 juveniles were maintained in 90-L tanks and treated with increasing concentrations of ammonia and nitrite, except during the recovery test. All treatments were performed with two replicates. The median lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) of 24, 48, 72 and 96 h were estimated at 30.12; 24.35; 19.24 and 18.68 mg.L<sup>-1</sup> TA-N; 5.37; 4.57; 3.75 and 3.66 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N and 20.37; 7.78; 7.09 and 5.86 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, respectively. The NO<sub>2</sub><sup>-</sup> caused significant decrease in hematocrit and increase in the urea levels during short-term exposure, with recovery of homeostasis after the subchronic and detox period. Acute exposure to ammonia increased the enzyme profile of transaminases, glucose and urea. Urea concentration remained high in the subchronic and detox tests. Histopathologies were observed in animals exposed to ammonia in both toxicity tests. We highlighted the detachment of epithelium, hyperemia and necrosis in the gills. Exposure to NO<sub>2</sub><sup>-</sup> caused epithelium detachment and aneurysm. Vacuolization and swelling of hepatocytes were the most common injury for both pollutants. We concluded that the *L. alexandri* has moderate tolerance to ammonia and nitrite. The recovery period revealed remedial response to ammonia and nitrite exposure.

Keywords: Aquaculture, nitrogenous compounds, recovery, toxicity.

## 1. INTRODUCTION

Ammonia and nitrite are toxic compounds to aquatic organisms (Miranda-Filho et al., 2009, Miranda-Filho and Costa, 2016). These pollutants are naturally present in the water by the excretion of aquatic animals (especially in production systems that employ high stocking densities) (Evans et al., 1999; Jensen, 2003; Evans et al., 2006; Park et al., 2007), by the degradation of not consumed feed and by the incomplete nitrification process (Peyghan and Azary-Takamy, 2002).

High densities of fish are normally employed in modern recirculation aquaculture systems (RAS). Thus, ammonia (main nitrogen catabolic product of aquatic animals) can accumulate causing chronic toxicity even at low concentration ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ ; Muir, 1982). Biological filters are used to nitrify ammonia to nitrite and then to nitrate by bacteria action. On the other hand, if the biofilter is not active or is badly sized, ammonia and/or nitrite can accumulate in the system (Pungrasmi et al., 2016).

In solution, ammonia exists in both un-ionized ammonia ( $\text{NH}_3$ ) and ionized ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) forms (Colt and Armstrong, 1981; Randall and Tsui 2002). The higher the pH and temperature, the greater the proportion of  $\text{NH}_3$  (Boyd, 2015). Nitrite is an intermediate product during bacterial nitrification of ammonia to nitrate.

In fish, intoxication by  $\text{NH}_3$  and by nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) occurs after the diffusion of these compounds through cell membranes (Roumieh et al., 2012) and active transport through the chloride cells (Huertas et al., 2002), respectively. In the intracellular environment, these toxicants can cause metabolic changes (Kroupova et al., 2005; Park et al., 2007; Hegazi et al., 2010), tissue injury (Cardoso et al., 1996; Peres et al., 2015) and may be sublethal or lethal even at low concentrations during short-term exposure (Yanbo et al., 2006; El-Sherif and El Feky, 2008).

Changes in biochemical blood parameters (Staurnes et al., 1994; Sinha et al., 2012; Peres et al., 2015) and histopathological abnormalities (Mallatt, 1985; Cardoso et al., 1996), caused by environmental pollutants, have been used as reliable biomarkers of fish health status (Bernet et al., 1999). However, the animal response to nitrogenous compounds effects for several fish species studied in aquaculture remains scarce. According to Martinez et al. (2006), studies on ammonia toxicity to Neotropical freshwater fish are still lacking due to the fact that fish farming is a recent activity in Brazil, with most of the domestic production still represented by exotic species.

The acute and subchronic toxicity tests can contribute with information about levels of safety, monitoring and control of nitrogenous compounds in aquatic systems

(Randall and Tsui, 2002). However, information about the detoxification process is scarce, since some injuries are reversible (Bernet et al., 1999) and fish have recoverability of polluting action (Diaz-Quiroz and Echeverri, 2013; Fu et al., 2013).

The siluriform *Lophiosilurus alexandri* popularly known as "pacamã" is a benthic fish of Pseudopimelodidae family. Due to high fishing pressure, BioBrasil (2014) considered the species as threatened. It is a promising candidate for aquaculture because of its appreciable meat without myoceptum. Several studies have been performed to introduce this fish in aquaculture. Costa et al. (2015) reported that *L. alexandri* reproduces naturally in captivity, and juveniles can be fed with commercial diets (Filho et al., 2014), despite having carnivorous feeding habits.

Thus, in the present study we evaluated the tolerance of *L. alexandri* juveniles to aqueous ammonia and nitrite on "pacamã" and the effect on blood parameters and integrity of some tissues.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Physico-chemical variables

For acute and subchronic toxicity tests with ammonia and nitrite, the physico-chemical parameters (pH, nitrite and ammonia) were monitored daily, using portable pH meter COMBO ( $\pm 0.05$ ) (Hanna, HI 98130), spectrophotometer (Biochrom Libra S22) and ion-selective electrode (ISE) (0.02 to 17,000 ppm) (Hanna, HI 4101), respectively.

For ammonia toxicity tests, concentrations were measured from 100 mL samples, plus 2 mL of ISA solution (Orion) and kept in magnetic stirrer (Hanna, HI 190M) with later reading employing ion-selective electrode for total ammonia (TA) plugged in a benchtop pH-meter (Hanna, HI 2211). For the estimation of un-ionized ammonia-N ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) were used the formulations described by Whitfield (1974) and modified by Ostrensky et al. (1992), considering pH, temperature, salinity and the concentration of total ammonia of each treatment. The concentrations of nitrite-N in test solution were measured using the method described by Bendschneider and Robinson (1952).

Photoperiod was 12 h, aeration was provided constantly by air diffusers and dissolved oxygen concentrations (DO) were measured using the digital oximeter (Hanna, HI 9146) (DO =  $6.76 \pm 0.15$  and  $6.49 \pm 1.14$   $\text{mg.L}^{-1}$  in acute toxicity tests and  $6.51 \pm 0.04$  and  $6.02 \pm 0.18$   $\text{mg.L}^{-1}$  in subchronic toxicity tests and detoxification tests, for ammonia and nitrite, respectively) and the temperature controlled throughout the tests with heaters and thermostats ( $27.96 \pm 0.3^\circ\text{C}$  and  $27.54 \pm 2.46^\circ\text{C}$  in acute toxicity tests and  $27.45 \pm 0.46^\circ\text{C}$  and  $27.36 \pm 0.68^\circ\text{C}$  in subchronic toxicity tests and detoxification tests, for ammonia and nitrite, respectively), both remaining within ideal for *L. alexandri* according to Costa et al. (2015) and Costa et al. (2016).

## 2.2 Acute toxicity test - ammonia and nitrite

Healthy *L. alexandri* (13.52±0.70 cm and 33.87±3.16 g, 120 days of age) were obtained from the larviculture laboratory of the Federal University of Minas Gerais, Brazil. Preliminary tests were used to determine the concentrations of ammonia and nitrite to be used in the definitive experiments.

During the acute toxicity tests, the fish were deprived of food and 100% medium was renewed every 24 h in a semi-static system. Nitrite and ammonia concentrations were monitored daily. The animals were kept in 90 liters' polyethylene container, maintaining a density of one fish per 7.5 liters of medium. Standard 96-h LC50 (median lethal concentration) of ammonia and nitrite on *L. alexandri* were performed in accordance with the protocols published by the American Society for Testing and Materials (ASTM, 2002). In brief, 12 fish were used in each treatment. The animals were exposed to five treatments with increasing ammonia concentrations: 3.40±1.25 mg.L<sup>-1</sup> TA-N (nitrogen in the form of total ammonia), 0.94±0.35 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N (nitrogen in the un-ionized form of ammonia); 7.48±4.07 mg.L<sup>-1</sup> TA-N, 1.64±1.19 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N; 18.48±1.51 mg.L<sup>-1</sup> TA-N, 3.58±0.61 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N; 32.09±7.68 mg.L<sup>-1</sup> TA-N, 5.83±3.07 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N; and 79.38 mg.L<sup>-1</sup> TA-N, 10.76±0.75 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N, all in duplicate, in addition to the control treatment (0.32 mg.L<sup>-1</sup> TA-N, 0.07±0.001 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N).

For NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, eight increasing concentrations were tested: 0.97±0.14 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; 1.86±0.17 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; 5.70±2.79 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; 15.14±2.88 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; 18.78±2.30 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; 55.24±1.94 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; 113.40±11.08 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; and 233.49±8.85 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; and control (0.05±0.005 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N), all treatments in duplicate.

The ammonia and nitrite concentrations were obtained from a stock solution of ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) P.A. (SIGMA®) and sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) P.A. (SIGMA®), respectively. During the first 24 h-test, observations were taken every 30 minutes; and from 24 to 96 h-test, observations were taken every 12 h. At this time, lethargic animals were removed, quantified (for the estimation of LC<sub>50</sub> 24 to 96 h), and euthanized by cord section. Gills and liver were collected and fixed in Bouin solution. Samples of blood and tissues were taken from lethargic fish, and fish that survived for 96 h. Lethargic fish were considered those with an evident reduction in their respiration (opercular movements and ventilatory frequency) and loss of balance. These

characteristics were observed during the preliminary tests and considered precursors of fish death.

### **2.3 Subchronic toxicity test - ammonia and nitrite**

Aqueous ammonia and nitrite concentrations that did not cause fish mortality for 96 h were evaluated in the subchronic experiments. For these trials, juvenile fish ( $13.52 \pm 0.70$  cm and  $33.87 \pm 3.16$  g, 120 days of age), 12 per treatment, were maintained for eight days in the concentrations: control ( $0.36 \pm 0.07$  mg.L<sup>-1</sup> TA-N,  $0.09 \pm 0.03$  mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N);  $3.40 \pm 1.25$  mg.L<sup>-1</sup> TA-N,  $0.94 \pm 0.35$  mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N and  $7.48 \pm 4.07$  mg.L<sup>-1</sup> TA-N,  $1.64 \pm 1.19$  mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N; and control ( $0.07 \pm 0.005$  mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N);  $0.97 \pm 0.14$  mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N;  $1.86 \pm 0.17$  mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, all in duplicate.

The fish were fed to apparent satiation twice daily for seven days, with the withdrawal of the not consumed feed after 30 minutes to maintain water quality. In the last 24 h, the animals were fasted and eight fish were collected and processed as described in acute toxicity tests.

During the subchronic test, the water was daily renewed (half of the total tank volume) to maintain medium quality. Prior to the renewals, concentrations of nitrite and ammonia were monitored. Afterwards, new media were added to maintain the concentrations originally tested.

### **2.4 Detoxification period**

The remaining animals (n = 4) from subchronic toxicity tests (in duplicate) were transferred into ammonia-free and nitrite-free water, respectively, and kept for four days with 100% daily renewals with preheated water ( $28.08 \pm 0.48^\circ\text{C}$ ) and aerated (DO =  $6.86 \pm 0.04$  mg.L<sup>-1</sup>) for ammonia detoxification and  $27.82 \pm 0.83^\circ\text{C}$  with DO =  $6.51 \pm 1.56$  mg.L<sup>-1</sup> for nitrite detoxification.

Daily renewals were performed as described in item 2.3. The food was offered as described previously, with fasting in the last 24 h before biological sampling.

### **2.5 Hematology and blood biochemistry analyses**

Fish were collected from each treatment during acute, subchronic and detox experiments to carry out hematology and blood biochemistry studies, as already described. The animals were punctured by the tail vein in ventral access to collect blood, using hypodermic syringe (1 mL) previously heparinized. The blood sampled was transferred to a 1.5 mL eppendorf with 10% heparin relative to blood volume. An aliquot of 4 μL was taken for hemoglobin analysis by cyanmethaemoglobin reaction with commercial kit (Bioclin<sup>®</sup>, Belo Horizonte, MG, Brazil). A sample of whole blood



was collected in hematocrit capillary tube for analysis on microhematocrit centrifuge (Laborline, Micro-spin) during 15 minutes at 10,000 rpm. The remaining blood was centrifuged (Mikro120, Hettich) in two stages, at 100 rpm for one minute and at 300 rpm for four minutes to collect plasma. Subsequently, commercial kits (Synermed<sup>®</sup>) were used for alanine aminotransferase analysis (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), glucose, albumin, total protein, creatine kinase (CK), gamma-glutamyl transferase (GGT), urea and creatinine. Likewise, for lactate analysis was used commercial kit Bioclin<sup>®</sup>. The analyses were performed on Cobas Mira-Plus unit-Roche<sup>®</sup> (Roche Diagnostic Systems) equipment.

## 2.6 Histological study

After blood collection and euthanasia, gills and liver of four fish per treatment were fixed in Bouin solution for 12 h and then transferred to 70% ethanol for later histological analysis and stained with hematoxylin and eosin. The slides were examined and photomicrographs were taken using light microscope for histopathological examination.

The lesions observed in the gills were classified according to Bernet et al. (1999) in three factors: (1) minimal pathological importance, where the damage is reversible upon termination of exposure to toxicant; (2) moderate pathological importance, where the injury is reversible in some cases after the end of exposure; and (3) severe pathological importance, where the lesion is typically irreversible and leads to partial or complete loss of organ function. All lesions were assessed using a scale ranging from: 0= unchanged, 2= mild occurrence, 4= moderate occurrence, and 6= severe occurrence. Intermediate values 1, 3, and 5 were also considered.

Using the factor of importance and the score value, the gill injury index (IG) was calculated as:  $I_G = \sum_{rp} \sum_{alt} (aw)$ . Where, rp= reaction pattern, alt= alteration, a= score, w= factor of importance.

The present index represents the degree of branchial lesion and the higher the index, the greater the tissue damage.

## 2.7 Statistical analysis

For acute toxicity tests with nitrogenous compounds, the LC<sub>50</sub> was estimated from the mortality data every 24 h using the software Trimmed Spearman Karber method (Hamilton et al., 1977) and the safety level was calculated according to Sprague (1971). Blood parameters (acute toxicity, subchronic toxicity and detoxification) were compared by one-way ANOVA and subsequently Tukey test (5% probability). For the

analysis, we used the statistical program Statistical Analysis System (SAS Institute, version 8.0). All analyses were submitted to evaluation of the normality of errors (Cramer-von Mises) and homoscedasticity of variance (Levene's).

### 3 RESULTS

#### 3.1 Water Parameters

The mean pH data were  $8.62 \pm 0.28$  and  $8.93 \pm 0.20$  for the toxicity tests with ammonia and nitrite, respectively. There were no significant differences in pH values in the acute and subchronic tests with nitrogenous compounds as well as in the detoxification tests. The mean conductivity and salinity data for acute and subchronic nitrite toxicity tests and detoxification trial were respectively:  $0.188 \pm 0.005$  to  $1.735 \pm 0.007 \mu\text{S.cm}^{-1}$  and  $0.079 \pm 0.003$  to  $0.86 \pm 0.005\%$ ;  $0.188 \pm 0.008$  to  $0.242 \pm 0.004 \mu\text{S.cm}^{-1}$  and  $0.092 \pm 0.004$  to  $0.120 \pm 0.005\%$ ; and  $0.171 \pm 0.022$  to  $0.180 \pm 0.006 \mu\text{S.cm}^{-1}$  and  $0.088 \pm 0.008$  to  $0.09 \pm 0.009\%$ .

#### 3.2 Acute toxicity tests - ammonia and nitrite

The ammonia  $\text{LC}_{50}$  for 24, 48, 72 and 96 h were estimated at 30.12; 24.35; 19.24 and 18.68  $\text{mg.L}^{-1}$  TA-N; 5.37; 4.57; 3.75 and 3.66  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3\text{-N}$ , respectively. For nitrite the  $\text{LC}_{50}$  were estimated at 20.37; 7.78; 7.09 and 5.86  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NO}_2\text{-N}$ , respectively. The safety levels were estimated at 1.87  $\text{mg.L}^{-1}$  TA-N ; 0.37  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3\text{-N}$  and 0.59  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NO}_2\text{-N}$ , according to the application factor proposed by Sprague (1971).

The main hematological alterations after 96 h exposure to ammonia and nitrite, are elucidated below. This is the first report on *L. alexandri* blood profiles reported in the literature. The parameters of animals exposed to lethal concentrations of ammonia are given in table 1.

The mean hemoglobin levels decreased ( $P < 0.05$ ), while glucose, urea and AST levels were higher ( $P < 0.05$ ) in all treatments with ammonia in comparison with the control condition. The mean GGT concentration differed only in the treatment  $10.76 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3\text{-N}$ . There were no significant differences in mean levels of creatinine, lactate, total protein and albumin in organisms exposed to ammonia as compared to the control treatment. Likewise, there was no difference in hematocrit ( $P > 0.05$ ).

From the concentration  $3.58 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3\text{-N}$ , mean AST concentration was increased, not accompanied by ALT. Increase in GGT concentration in the treatment  $10.76 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3\text{-N}$  was also observed with severe swelling in the liver. On the other

hand, decrease in the concentration of CK was observed from 5.83 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N and there was no significant difference in ALP, compared to the control treatment.

Blood parameters of animals shortly exposed to nitrite are presented in table 2. In fish exposed to 18.78; 55.24; 113.40 and 233.49 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, a brown color of blood was observed when it was sampled. Mean glucose levels were high in all concentrations tested, differing from the control treatment. On the other hand, plasma concentrations of CK, creatinine, GGT, total hemoglobin, hematocrit and total proteins did not differ from the control treatment. Mean albumin, AST and ALP were significantly higher than control from 18.78 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; lactate and urea from the concentration 15.14 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; and ALT was significantly higher than control in all treatments.

### 3.3 Subchronic toxicity tests - ammonia and nitrite

No mortality was observed during the experimental period. Blood parameters of animals exposed to subchronic concentrations of ammonia and nitrite are given in table 3.

Table 1. Mean ( $\pm$  SD) of *Lophiosilurus alexandri* blood parameters after 96 hours of acute exposure to ammonia.

Parameters	Ammonia concentrations (mg.L <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> -N)			
	0.07 (control)	3.58	5.83	10.76
Albumin (g.dL <sup>-1</sup> )	0.82 $\pm$ 0.11ns	0.93 $\pm$ 0.19ns	1.09 $\pm$ 0.16ns	1.04 $\pm$ 0.16ns
ALT (UI.dL <sup>-1</sup> )	47.44 $\pm$ 28.59a	17.87 $\pm$ 8.59c	33.72 $\pm$ 15.44b	32.92 $\pm$ 12.91b
AST (U.LL <sup>-1</sup> )	87.54 $\pm$ 18.25c	169.81 $\pm$ 94.67a	168.08 $\pm$ 81.85a	140.37 $\pm$ 53.98b
CK (U.LL <sup>-1</sup> )	1400.74 $\pm$ 321.24a	376.95 $\pm$ 324.90b	342.60 $\pm$ 143.97b	355.65 $\pm$ 68.46b
Creatinine (mg.dL <sup>-1</sup> )	0.57 $\pm$ 0.13ns	0.46 $\pm$ 0.29ns	0.42 $\pm$ 0.23ns	0.42 $\pm$ 0.22ns
ALP (UI.L <sup>-1</sup> )	38.25 $\pm$ 8.95ns	53.03 $\pm$ 18.35ns	46.22 $\pm$ 13.39ns	39.71 $\pm$ 6.12ns
GGT (U.LL <sup>-1</sup> )	7.94 $\pm$ 2.65b	12.38 $\pm$ 4.25b	14.90 $\pm$ 2.54b	18.99 $\pm$ 5.14a
Glucose (mg.dL <sup>-1</sup> )	3.30 $\pm$ 0.69c	32.54 $\pm$ 19.98b	48.53 $\pm$ 19.78b	132.04 $\pm$ 49.00a
Hemoglobin (g.dL <sup>-1</sup> )	13.93 $\pm$ 2.27a	5.61 $\pm$ 1.83bc	7.61 $\pm$ 2.90b	6.35 $\pm$ 1.62b
Hematocrit (%)	18.88 $\pm$ 1.81ns	18.73 $\pm$ 1.54ns	21.91 $\pm$ 2.35ns	20.92 $\pm$ 2.63ns
Lactate (mmol.L <sup>-1</sup> )	25.41 $\pm$ 7.82ns	35.07 $\pm$ 24.04ns	33.43 $\pm$ 14.37ns	34.91 $\pm$ 15.13ns
Total protein (g.dL <sup>-1</sup> )	3.25 $\pm$ 0.19ns	3.51 $\pm$ 0.36ns	4.17 $\pm$ 0.36ns	3.89 $\pm$ 0.17ns
Urea (mg.L <sup>-1</sup> )	3.62 $\pm$ 1.35b	43.05 $\pm$ 27.44a	42.90 $\pm$ 15.00a	40.70 $\pm$ 13.70a

Means followed by the same letter horizontally do not differ statistically from each other ( $P > 0.05$ ) for different concentrations (ANOVA). ns means not significant compared to the control treatment. Note: ALT. alanine aminotransferase; AST. aspartate aminotransferase; CK. creatine kinase; ALP. alkaline phosphatase; GGT. gamma-glutamyl transferase.

Table 2. Mean ( $\pm$  SD) of *Lophiosilurus alexandri* blood parameters after 96 hours of acute exposure to nitrite.

Parameters	Nitrite concentrations (mg.L <sup>-1</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)						
	0.05(control)	5.70	15.14	18.78	55.24	113.40	233.49
Albumin (g.dL <sup>-1</sup> )	0.69 $\pm$ 0.08b	0.62 $\pm$ 0.18 b	0.72 $\pm$ 0.17 ab	0.79 $\pm$ 0.13 a	0.82 $\pm$ 0.12 a	0.76 $\pm$ 0.12 a	0.79 $\pm$ 0.14 a
ALT (UI.dL <sup>-1</sup> )	34.08 $\pm$ 9.83c	170.52 $\pm$ 74.76 b	227.33 $\pm$ 81.26 b	327.50 $\pm$ 78.02 b	354.62 $\pm$ 141.98ab	381.47 $\pm$ 91.08 a	407.33 $\pm$ 117.51 a
AST (UI.L <sup>-1</sup> )	112.60 $\pm$ 36.04c	153.25 $\pm$ 99.66 bc	194.28 $\pm$ 83.29 bc	229.55 $\pm$ 87.52 b	269.91 $\pm$ 115.47 ab	313.52 $\pm$ 121.44 a	300.63 $\pm$ 105.03 a
CK (UI.L <sup>-1</sup> )	1334.41 $\pm$ 1135.15ns	2263.10 $\pm$ 1109.92 ns	2204.68 $\pm$ 1118.48 ns	2265.47 $\pm$ 1384.51 ns	2050.25 $\pm$ 1055.98 ns	1880.77 $\pm$ 1506.04 ns	2951.89 $\pm$ 1373.01 ns
Creatinine (mg.dL <sup>-1</sup> )	1.14 $\pm$ 0.42ns	1.18 $\pm$ 0.31 ns	0.91 $\pm$ 0.29 ns	0.79 $\pm$ 0.41 ns	0.94 $\pm$ 0.62 ns	0.83 $\pm$ 0.28 ns	0.91 $\pm$ 0.31 ns
ALP (UI L <sup>-1</sup> )	37.27 $\pm$ 5.02b	42.11 $\pm$ 3.05 ab	42.10 $\pm$ 9.06 ab	43.74 $\pm$ 3.17 a	44.86 $\pm$ 9.98 a	44.81 $\pm$ 5.25 a	44.38 $\pm$ 6.90 a
GGT (UI.L <sup>-1</sup> )	3.85 $\pm$ 0.59ns	3.35 $\pm$ 1.14 ns	4.15 $\pm$ 0.68 ns	6.06 $\pm$ 3.28 ns	9.83 $\pm$ 4.17 ns	3.73 $\pm$ 2.41 ns	2.58 $\pm$ 1.77 ns
Glucose (mg.dL <sup>-1</sup> )	7.22 $\pm$ 3.96c	112.94 $\pm$ 35.88 a	80.32 $\pm$ 36.31 b	89.36 $\pm$ 46.17 ab	117.28 $\pm$ 0.66 a	83.67 $\pm$ 42.45 b	88.87 $\pm$ 40.86 ab
Hematocrit (%)	19.38 $\pm$ 4.01a	12.15 $\pm$ 2.32 c	13.15 $\pm$ 3.85 c	16.10 $\pm$ 2.13 b	15.59 $\pm$ 3.47b c	16.23 $\pm$ 1.38 b	15.92 $\pm$ 2.52 bc
Hemoglobin (g.dL <sup>-1</sup> )	4.10 $\pm$ 2.73ns	5.31 $\pm$ 2.28 ns	5.98 $\pm$ 2.27 ns	4.62 $\pm$ 1.09 ns	5.16 $\pm$ 2.12 ns	5.63 $\pm$ 1.99 ns	5.68 $\pm$ 2.02 ns
Lactate (mmol.L <sup>-1</sup> )	19.04 $\pm$ 8.34c	39.28 $\pm$ 25.14 bc	72.98 $\pm$ 29.87 b	91.90 $\pm$ 30.39 ab	86.84 $\pm$ 38.35 ab	95.98 $\pm$ 37.88 a	95.29 $\pm$ 29.22 a
Total protein (g.dL <sup>-1</sup> )	2.34 $\pm$ 0.24ns	2.11 $\pm$ 0.70 ns	2.43 $\pm$ 0.60 ns	2.66 $\pm$ 0.31 ns	2.37 $\pm$ 0.82 ns	2.56 $\pm$ 0.26 ns	2.70 $\pm$ 0.30 ns
Urea (mg.L <sup>-1</sup> )	4.10 $\pm$ 1.14c	5.62 $\pm$ 2.50 c	8.67 $\pm$ 1.83 b	11.92 $\pm$ 6.29 ab	12.24 $\pm$ 7.82 a	13.77 $\pm$ 6.46 a	13.16 $\pm$ 8.16 a

Means followed by the same letter horizontally do not differ statistically from each other ( $P > 0.05$ ) for different concentrations (ANOVA). ns means not significant compared to the control treatment. Note: ALT. alanine aminotransferase; AST. aspartate aminotransferase; CK. creatine kinase; ALP. alkaline phosphatase; GGT. gamma-glutamyl transferase.

Table 3. Mean ( $\pm$  SD) of *Lophiosilurus alexandri* blood parameters in subchronic toxicity test to ammonia and nitrite.

Parameters	Ammonia concentrations (mg.L <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> -N)			Nitrite concentrations (mg.L <sup>-1</sup> NO <sub>2</sub> -N)		
	0.09 (control)	0.94	1.64	0.07 (control)	0.97	1.86
Albumin (g.dL <sup>-1</sup> )	0.85 $\pm$	0.84 $\pm$	0.76 $\pm$	0.49 $\pm$	0.57 $\pm$	0.88 $\pm$
	0.07ns	0.05ns	0.11ns	0.17b	0.07b	0.19a
ALT (UI.dL <sup>-1</sup> )	31.18 $\pm$	39.60 $\pm$	60.08 $\pm$	88.32 $\pm$	98.94 $\pm$	134.21 $\pm$
	19.38ns	20.69ns	32.72ns	20.26ns	24.72ns	77.82ns
AST (U.LL <sup>-1</sup> )	100.69 $\pm$	118.28 $\pm$	132.24 $\pm$	2.39 $\pm$	4.68 $\pm$	4.75 $\pm$
	15.62ns	37.25ns	50.62ns	0.93ns	1.46ns	2.90ns
CK (U.LL <sup>-1</sup> )	2692.95 $\pm$	2925.85 $\pm$	852.82 $\pm$	1113.53 $\pm$	1376.53 $\pm$	2131.52 $\pm$
	938.67a	1116.98a	365.90b	480.63ns	686.44ns	587.44ns
Creatinine (mg.dL <sup>-1</sup> )	0.56 $\pm$	0.59 $\pm$	0.38 $\pm$	1.04 $\pm$	1.02 $\pm$	1.00 $\pm$
	0.15a	0.08a	0.09b	0.14ns	0.28ns	0.15ns
ALP (UI.L <sup>-1</sup> )	36.39 $\pm$	36.84 $\pm$	41.03 $\pm$	32.87 $\pm$	32.62 $\pm$	33.06 $\pm$
	6.64ns	5.98ns	22.07ns	2.98ns	4.58ns	2.96ns
GGT (U.LL <sup>-1</sup> )	1.60 $\pm$	1.07 $\pm$	7.08 $\pm$	20.60 $\pm$	7.33 $\pm$	3.78 $\pm$
	0.61ns	0.13ns	4.83ns	8.26a	2.64b	2.10b
Glucose (mg.dL <sup>-1</sup> )	2.14 $\pm$	1.58 $\pm$	1.57 $\pm$	2.88 $\pm$	10.17 $\pm$	9.12 $\pm$
	1.03ns	0.43ns	0.33ns	1.63ns	6.08ns	4.52ns
Hemoglobin (g.dL <sup>-1</sup> )	7.32 $\pm$	7.36 $\pm$	5.82 $\pm$	19.50 $\pm$	16.81 $\pm$	12.81 $\pm$
	1.89ns	1.68ns	0.98ns	4.34a	2.74ab	2.74bc
Hematocrit (%)	20.00 $\pm$	18.88 $\pm$	18.88 $\pm$	13.38 $\pm$	11.56 $\pm$	8.44 $\pm$
	2.51ns	1.81ns	3.44ns	6.31ns	5.59ns	3.27ns
Lactate (mmol.L <sup>-1</sup> )	4.06 $\pm$	5.86 $\pm$	7.21 $\pm$	24.03 $\pm$	25.26 $\pm$	23.32 $\pm$
	2.51b	1.24b	1.88a	7.37ns	5.78ns	4.24ns
Total protein (g.dL <sup>-1</sup> )	3.03 $\pm$	3.01 $\pm$	2.84 $\pm$	2.40 $\pm$	2.42 $\pm$	2.62 $\pm$
	0.09ns	0.15ns	0.17ns	0.36ns	0.19ns	0.28ns
Urea (mg.L <sup>-1</sup> )	5.59 $\pm$	4.57 $\pm$	16.84 $\pm$	4.52 $\pm$	5.35 $\pm$	5.40 $\pm$
	1.98b	0.83b	9.54a	2.32ns	1.74ns	2.27ns

Means followed by the same letter horizontally do not differ statistically from each other ( $P > 0.05$ ) for different concentrations (ANOVA). ns means not significant compared to the control treatment. Note: ALT. alanine aminotransferase; AST. aspartate aminotransferase; CK. creatine kinase; ALP. alkaline phosphatase; GGT. gamma-glutamyl transferase.

Intoxication caused by ammonia after 8 days of exposure revealed significant differences in plasma concentrations of CK, creatinine, lactate, urea and total protein in fish exposed to 1.64 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N in comparison to the control treatment. No differences were found in mean albumin concentrations, ALT, AST, ALP, GGT, glucose, hemoglobin and hematocrit in all concentrations tested.

Increasing albumin ( $P < 0.05$ ) in concentration  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ , decreasing ( $P < 0.05$ ) in GGT levels above  $0.07 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$  and hemoglobin levels at the concentration of  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ , were observed. Other blood parameters for the different concentrations of  $\text{NO}_2^-$  showed no significant differences compared to control treatment. Exposure to nitrite increased the total protein concentration in all treatments, different from urea which only increased in the concentration  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ .

### **3.4 Detoxification tests after subchronic exposure to ammonia and nitrite**

Blood parameters of animals after detoxification from subchronic concentrations of ammonia and nitrite are presented in table 4.

The fish kept four days in ammonia-free environment showed lower levels ( $P < 0.05$ ) of glucose and higher levels ( $P < 0.05$ ) for AST, ALT, lactate and urea, in comparison to control, when exposure was  $1.64 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3 \text{-N}$ . The mean albumin, CK, creatinine, ALP, GGT, hemoglobin, hematocrit, and total protein did not differ among the treatments after detoxification.

After four days of nitrite-free period, a decrease ( $P < 0.05$ ) in the albumin level was observed when fish was exposed to  $0.97 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ . Decreases ( $P < 0.05$ ) in mean hematocrit and GGT level and increase ( $P < 0.05$ ) in the concentration of AST were observed after recovery time in the treatment that was  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ .

The lactate also significantly decreased in the two treatments evaluated when compared to the control condition. No differences were observed in mean ALT, CK, creatinine, ALP, glucose, hemoglobin, total protein and urea in comparison to the control.

Observing the mean blood parameters of *L. alexandri* in subchronic toxicity test to ammonia and nitrite (Tab. 3), it is possible to describe that some parameters did not change even after the recovery time.

Table 4. Mean ( $\pm$  SD) of *Lophiosilurus alexandri* blood parameters after detoxification test to ammonia and nitrite.

Parameters	Ammonia concentrations (mg.L <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> -N)			Nitrite concentrations (mg.L <sup>-1</sup> NO <sub>2</sub> -N)		
	0.09 (controle)	0.94	1.64	0.072 (controle)	0.97	1.86
Albumin (g.dL <sup>-1</sup> )	0.44 $\pm$ 0.08ns	0.40 $\pm$ 0.11ns	0.40 $\pm$ 0.07ns	0.59 $\pm$ 0.07a	0.44 $\pm$ 0.12b	0.70 $\pm$ 0.06a
ALT (UI.dL <sup>-1</sup> )	22.49 $\pm$ 13.81b	13.62 $\pm$ 6.27b	49.57 $\pm$ 10.67a	103.44 $\pm$ 22.19ns	115.05 $\pm$ 54.44ns	165.37 $\pm$ 110.06ns
AST (UI.L <sup>-1</sup> )	65.02 $\pm$ 15.35b	68.78 $\pm$ 15.54b	94.27 $\pm$ 26.28a	2.93 $\pm$ 0.80b	2.25 $\pm$ 1.01b	5.08 $\pm$ 2.65a
CK (UI.L <sup>-1</sup> )	1252.25 $\pm$ 704.44ns	3057.14 $\pm$ 1287.10ns	2256.60 $\pm$ 1403.69ns	2255.82 $\pm$ 684.42ns	1292.26 $\pm$ 569.53ns	2409.81 $\pm$ 711.61ns
Creatinine (mg.dL <sup>-1</sup> )	0.50 $\pm$ 0.23ns	0.58 $\pm$ 0.32ns	0.32 $\pm$ 0.13ns	0.93 $\pm$ 0.17ns	0.91 $\pm$ 0.44ns	0.97 $\pm$ 0.13ns
ALP (UI.L <sup>-1</sup> )	32.88 $\pm$ 11.46ns	36.46 $\pm$ 5.27ns	33.62 $\pm$ 4.20ns	35.68 $\pm$ 2.16ns	31.50 $\pm$ 3.81ns	31.22 $\pm$ 4.47ns
GGT (UI.L <sup>-1</sup> )	7.00 $\pm$ 3.31ns	6.73 $\pm$ 1.22ns	6.58 $\pm$ 3.94ns	18.44 $\pm$ 3.95a	17.93 $\pm$ 8.59a	5.26 $\pm$ 0.80b
Glucose (mg.dL <sup>-1</sup> )	6.02 $\pm$ 2.32a	4.94 $\pm$ 1.08a	2.77 $\pm$ 0.45b	6.99 $\pm$ 2.18ns	6.64 $\pm$ 1.69ns	7.44 $\pm$ 3.94ns
Hemoglobin (g.dL <sup>-1</sup> )	9.79 $\pm$ 4.03ns	9.42 $\pm$ 4.62ns	10.36 $\pm$ 3.65ns	16.38 $\pm$ 3.38ns	16.63 $\pm$ 2.83ns	15.00 $\pm$ 1.41ns
Hematocrit (%)	32.88 $\pm$ 11.46ns	36.46 $\pm$ 5.27ns	33.62 $\pm$ 4.20ns	6.32 $\pm$ 2.26a	4.56 $\pm$ 1.43a	1.96 $\pm$ 0.41b
Lactate (mmol.L <sup>-1</sup> )	13.98 $\pm$ 6.73b	23.45 $\pm$ 8.62b	31.28 $\pm$ 16.89a	30.49 $\pm$ 0.65a	4.41 $\pm$ 1.02b	6.05 $\pm$ 2.08b
Total protein (g.dL <sup>-1</sup> )	2.88 $\pm$ 0.21ns	2.75 $\pm$ 0.38ns	2.84 $\pm$ 0.20ns	2.33 $\pm$ 0.13ns	2.07 $\pm$ 0.45ns	2.42 $\pm$ 0.11ns
Urea (mg.L <sup>-1</sup> )	8.65 $\pm$ 4.07b	6.20 $\pm$ 3.53b	20.37 $\pm$ 8.71a	4.04 $\pm$ 1.59ns	5.11 $\pm$ 1.97ns	4.59 $\pm$ 2.54ns

Means followed by the same letter horizontally do not differ statistically from each other ( $P > 0.05$ ) for different concentrations (ANOVA). ns means not significant compared to the control treatment. Note: ALT. alanine aminotransferase; AST. aspartate aminotransferase; CK. creatine kinase; ALP. alkaline phosphatase; GGT. gamma-glutamyl transferase.

### 3.5 Histological observations

Histological examination was carried out in groups exposed to acute concentrations of ammonia and nitrite during 96 h and revealed changes in the gills and liver. The normal gill structure can be seen in figure 1A, showing the typical structural organization of the primary lamellae separated by clear interlayer spaces where few minor injuries were found on the gills of the individuals of the control group, as mild edema and hyperemia. In the treatments 5.69; 15.14 and 18.78 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N were observed hypertrophy with decrease in the interlayer space with predominant occurrence in the proximal third of the primary lamellae. It was also detected discrete epithelial displacement and aneurysm (telangiectasia). The most severe lesions were observed in the concentrations of 3.58 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N and 55.24 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, such as structural changes of moderate to severe being registered with the displacement epithelium, aneurisms and necrosis compromising most of the gill arch (Fig. 1B and 1C; Tab. 5). In the treatments 10.76 and 3.58 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N, as well as 233.49 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, folds were observed at the distal ends of the secondary lamellae due to moderate regressive changes in architecture and structure of them (without proof). Decrease of surface cells and detachment of the gill epithelium is observed in the lethal concentration of 113.40 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N (Fig. 1D). The injury expressed by gill index also depicts organ damage (Tab. 5). It is observed that the animals exposed to lethal concentrations and to higher sublethal concentrations of ammonia and nitrite presented greater degree of damage. However, after the detoxification period (four days), it was possible to observe a mild tissue recovery, both for sublethal exposure to ammonia and nitrite.

After eight days of subchronic exposure to nitrogenous compounds, we observed disruptions in the architecture and structure of secondary lamellae in mild to moderate, with some records of hypertrophy and aneurysm (Fig. 1E). However, lesions in the concentration of 1.64 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N and 1.86 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N were significant, but regressed after four-days of recovery (Tab. 5). Although some injuries as hyperemia, retraction of epithelial cells and epithelial displacement, were present after four days of detoxification, gill tissue damage may be considered mild (Fig. 1F).

In figure 2A, it can be seen the liver of the control group. The vacuolation of hepatocytes and intracellular edema with the commitment of the sinusoidal spaces were seen more clearly from 10.76 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N, for ammonia and in the concentration



113.40 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, for nitrite (Fig. 2B to 2D). In figures 2E and 2F are shown swollen hepatocytes and congested sinusoids after subchronic exposure to nitrite (1.86 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) and less swollen hepatocytes and normal liver cells after a period of detoxification to ammonia (1.64 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N), respectively.

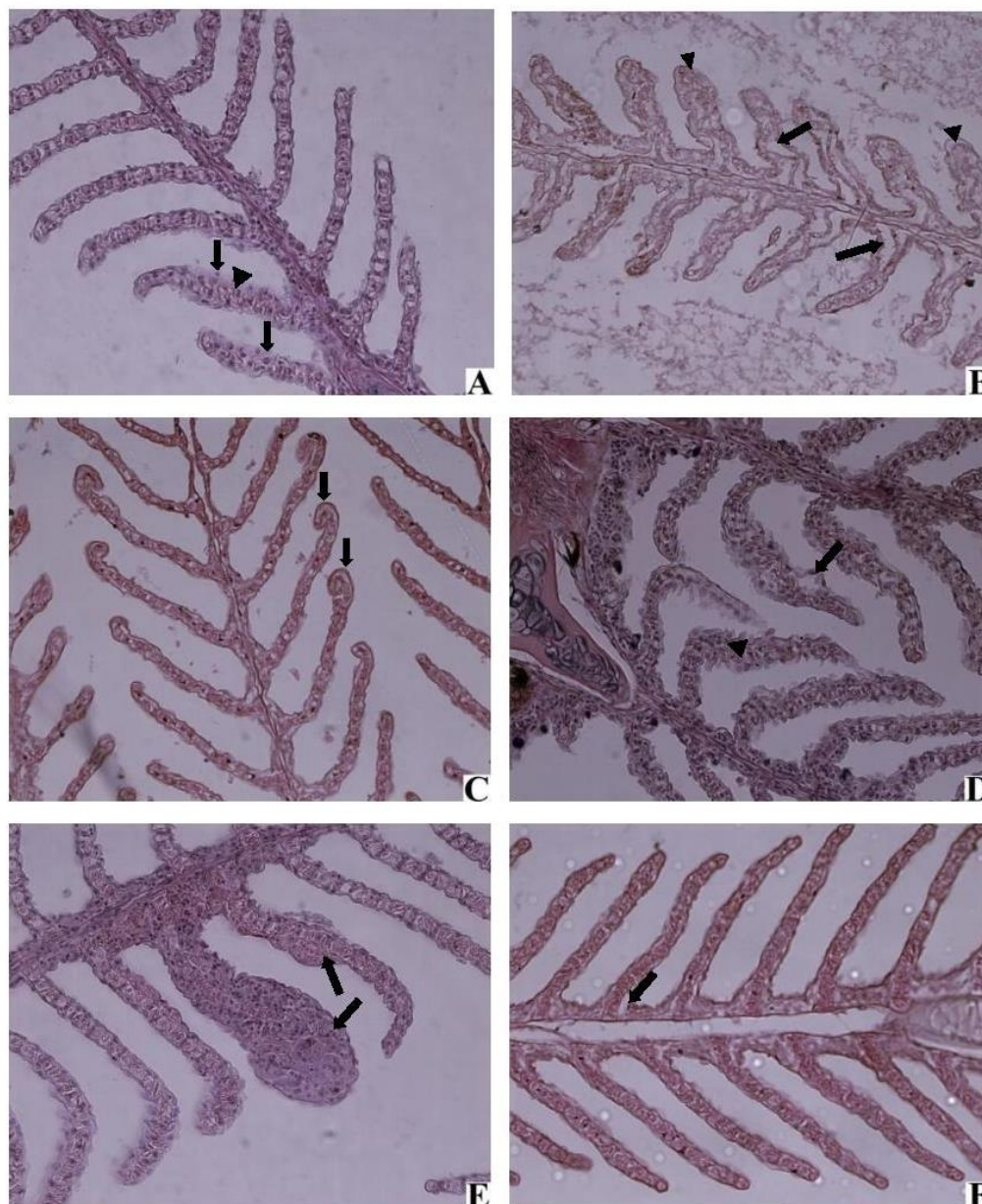


Figure 1. Photomicrographs of *Lophiosilurus alexandri* gill after acute exposure (96 hours), sub-chronic (8 days) and detoxification test (4 days). Tests with ammonia and nitrite. (A) Treatment control displaying mild circulatory alteration with cellular edema (arrows) and hyperemia (heads of arrows); (B) Necrosis (heads of arrows) and severe detachment of the respiratory epithelium (arrows) High severity degree of lifting of filamentary and lamellar epithelium in 3.58 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N; (C) Folds in the distal ends of the secondary lamellae in the concentration 10.76 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>-N; (D) Retraction of superficial cells (heads of arrows) and epithelium detachment (arrow) in 113.40 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; (E) fish exposed to 1.86 mg.L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-

N after 4 days presenting aneurysm (telangiectasia); (F) Gill after detoxification of  $1.64 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3\text{-N}$  with mild epithelium detachment (arrow); HE 400X.

Table 5. Indices of gill lesions ( $I_G$ ) in *Lophiosilurus alexandri* juvenile after acute exposure (96 hours), subchronic (8 days) and detoxification test (4 days).

Ammonia ( $\text{mg.L}^{-1} \text{NH}_3\text{-N}$ )						Nitrite ( $\text{mg.L}^{-1} \text{NO}_2\text{-N}$ )					
Acute	$I_G$	Subchronic	$I_G$	Detoxification	$I_G$	Acute	$I_G$	Subchronic	$I_G$	Detoxification	$I_G$
3.58	27.0± 11.53 <sup>b</sup>	0.94	9.33± 3.21 <sup>a</sup>	0.94	5.33± 0.58 <sup>a</sup>	5.69	15.33± 8.14 <sup>a</sup>	0.97	17.0± 1.73 <sup>a</sup>	0.97	8.0± 3.0 <sup>a</sup>
5.83	17.67± 0.58 <sup>b</sup>	1.64	27.33± 11.59 <sup>b</sup>	1.64	7.33± 2.31 <sup>a</sup>	15.14	16.0± 6.0 <sup>a</sup>	1.86	27.0± 1.73 <sup>b</sup>	1.86	8.0± 1.0 <sup>a</sup>
10.76	20.0± 2.65 <sup>b</sup>					18.78	18.0± 9.85 <sup>a</sup>				
						55.24	28.0± 2.65 <sup>b</sup>				
						113.40	16.33± 3.51 <sup>a</sup>				
						233.49	18.33± 3.06 <sup>a</sup>				

Statistical significant differences are shown by different letters ( $P < 0.05$ ) by Bonferroni test.

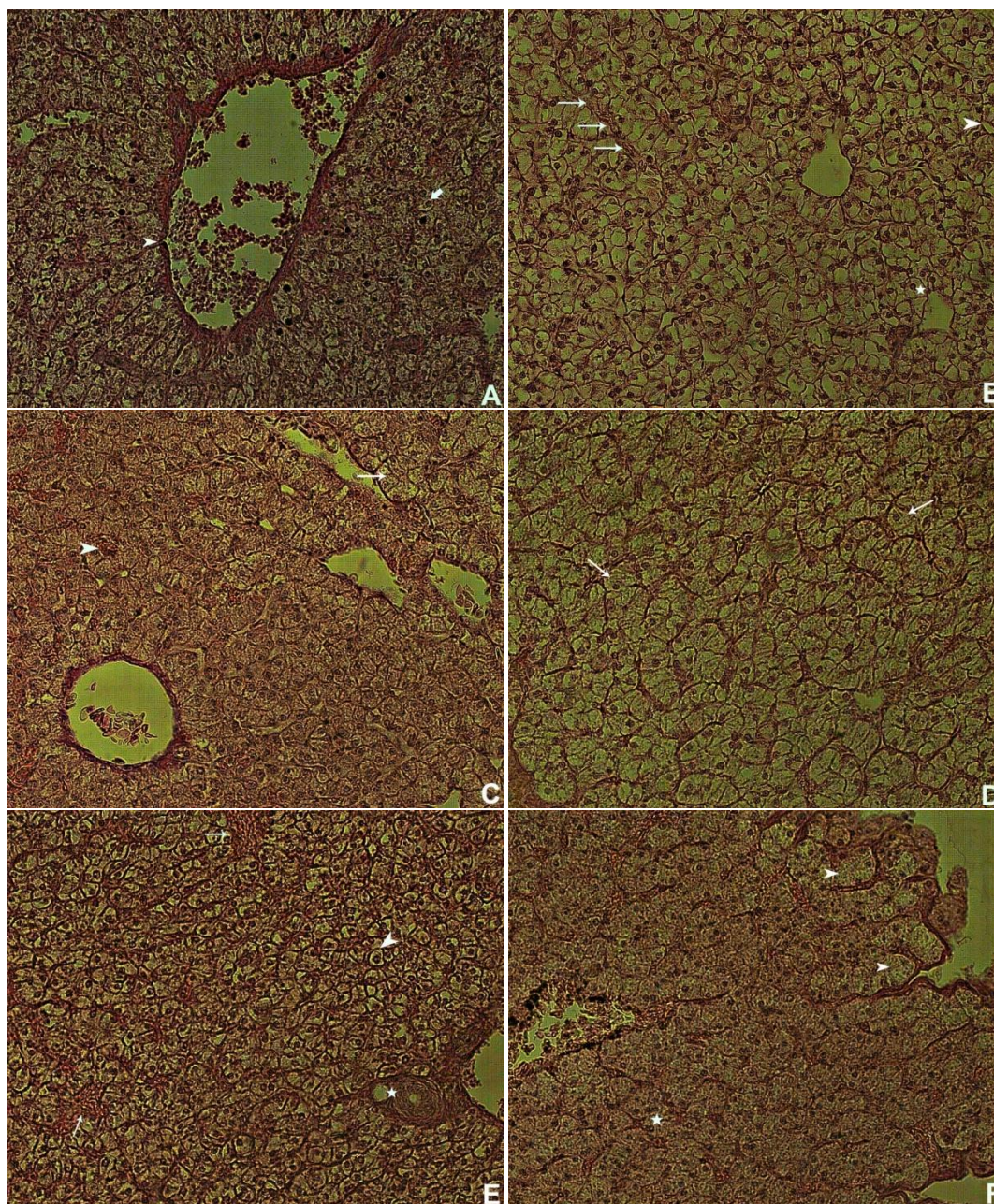


Figure 2. Photomicrographs of *Lophiosilurus alexandri* liver after acute exposure (96 hours), Subchronic (8 days) and detoxification testing (4 days). Tests with ammonia and nitrite. (A) Control treatment showing normal hepatic parenchyma of fish hepatocytes exhibiting well-defined, polyedric in shape (arrow), sinusoids (arrow head) and central lobular vein; (B) Acute exposure to  $10.76 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$  with swollen and vacuolated hepatocytes (star), hepatocytes with diffuse vacuolization in the cytoplasm (star), dilated sinusoids (arrow) and transverse sinusoids (arrow head); (C) Concentration  $113.40 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$ , liver with mild to moderate swelling (arrow); (D) Hepatocytes with severe swelling (arrows) after exposure in  $233.49 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$ ; (E) Congested sinusoids (arrow) and swollen hepatocytes (arrow head), portal space (star) after subchronic exposure to  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$ ; (F) normal hepatocytes (star) and swollen (heads of arrows) 4 days after detoxification to  $1.64 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ ; HE 400X.

#### 4 DISCUSSION

The nitrogenous compounds are notoriously toxicants to aquatic organisms (Miranda-Filho et al., 2009, Miranda-Filho and Costa, 2016) and cause physiological disorders (Jensen, 2003), tissue damage (Sinha et al., 2012), cell damage (Hegazi et al., 2010), and mortalities (Randall and Tsui, 2002). The results of the present study revealed through blood biochemistry and tissue observations that exposure to ammonia and nitrite caused deleterious effects in juvenile *L. alexandri*.

Ammonia acute toxicity was proportional to that found by Cardoso et al. (1996) working with juveniles (0.4 g) of the same species ( $LC_{50}48h = 0.92 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ ). According to the data of short-term tests, we noticed that the pacamã was more tolerant than the pacu *Piaractus mesopotamicus*  $LC_{50}96h = 0.014 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$  (Barbieri et al., 2015), the catfish *Ictalurus punctatus*  $LC_{50}96h = 0.5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$  (Colt and Tchobanoglous, 1976) and the carp *Cyprinus carpio*  $LC_{50}96h = 1.84 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$  (Hasan and Macintosh, 1986). However, it appeared less tolerant than Nile tilapia *Oreochromis niloticus*  $LC_{50}96h = 7.4 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$  (Benli and Köksal, 2005).

The brown color of blood (cyanotic coloring) was also cited by Svobodová et al. (2005a, 2005b), is known as a “disease of brown blood.” This fact is due to the presence of nitrite in the blood, which induces the oxidation of respiratory blood pigment (hemoglobin) to methemoglobin (Jensen, 2003). This signal may be useful in suspected excess of  $\text{NO}_2^-$  in the water; and it can be visually detected in the fish still alive when observing the gills. Despite the evidence of methemoglobinemia, no decrease in hemoglobin levels was observed in fish acutely exposed to nitrite. Huertas et al. (2002) working with acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) to nitrite, also reported higher levels of methemoglobin without decreasing the hemoglobin concentration.

The “pacamã” showed higher tolerance to  $\text{NO}_2^-$  compared to “tambaqui” *Colossoma macropomum*  $\text{LC}_{50/96\text{h}} = 1.82 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$  (Costa et al., 2004) and the characid *Brycon cephalus*  $\text{LC}_{50/96\text{h}} = 0.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$  (Aviles et al., 2004). However, *L. alexandri* tolerance was lower when compared to tilapia *O. niloticus*  $\text{LC}_{50/96\text{h}} = 28.18 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$  (Yanboo et al., 2006), as well as up to  $81 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$  (Atwood et al., 2001), and to yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*  $\text{LC}_{50/96\text{h}} = 69.06$  to  $196.05 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$  according to the stage of development of the fish (Zhang et al., 2012).

Safety levels estimated for the pacamã in this study were  $0.37 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3 \text{-N}$  and  $0.59 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ . For these estimated levels, we can corroborate the application factor proposed by Sprague (1971), since exposure to subchronic concentrations of ammonia and nitrite did not reflect on hematological changes. According to El-Shafai et al. (2004), the concentration of un-ionized ammonia should not exceed  $0.1 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3 \text{-N}$  to avoid deleterious effects on fish, which confirms the extreme toxicity of  $\text{NH}_3$ ; and among the acceptable values for freshwater fish in cultivation systems,  $\text{NO}_2^-$  should remain below  $1 \text{ mg.L}^{-1} \text{ de N-NO}_2^-$  (Handy and Poxton., 1993; Timmons and Ebeling, 2013), varying according to species, age and size (Lewis and Morris, 1986; Tomasso, 1986; Martinez and Souza, 2002; Jensen, 2003).

In the current study, “pacamã” responses to ammonia and nitrite intoxication were interpreted by blood parameters and histological lesions. Thus, it was observed that the concentration of glucose in plasma is a sensitive reliable indicator to acute stressors in fish as highlighted by Wagner and Congleton (2004). Mommsen et al. (1992) reported that hyperglycemia occurs due to processes involving catecholamines after a stressful stimulus. This may trigger hepatic (Wendelaar-Bonga, 1997) and muscular (Vijayavel et al., 2006) glycogenolysis for energy mobilization (Diricx et al.,

2013), which was observed in *L. alexandri* after acute exposure to both nitrogenous compounds.

According to Jensen (2003), fish when exposed to nitrite, show a reduction in blood oxygen saturation due to high levels of methemoglobin. Tissue hypoxia and, consequently, energy production by anaerobic via, can result in elevations in plasma lactate concentration, as noted in the present acute toxicity test for nitrite (from the concentration of 15.14 mg.L<sup>-1</sup> de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N), and its permanence for long periods can be related to methemoglobinemia, as described by Vijayavel et al. (2006). Thus, anaerobic routes would become the main resources for the maintenance of visceral energy for muscle catabolism, as reported by Moraes et al. (2006), especially in the white muscle that has glycogen as main source of energy (Smutná et al., 2002). Damages observed in gills and liver caused by nitrite tended to exacerbate the effects of hemoglobin oxidation (Mallatt, 1985; Cardoso et al., 1996; Perez et al., 2015).

One strategy used by some fish against ammonia poisoning, such as tilapia from Magadi lake, is to raise the use of urea or ornithine cycle, increasing the conversion of ammonia to urea, a less toxic metabolite (Randall and Tsui, 2002). Similar phenomenon was also reported by Diricx et al. (2013) working with carp exposed to ammonia. Additionally, as in this study, fish were not fed (acute toxicity tests) or had their feeding inhibited (subchronic toxicity tests), thereby, high urea concentration in the blood could be related to mobilization proteins as substrate for hepatic gluconeogenesis, as described by Barcellos et al. (2003).

To nitrite, Jensen, (2003) noted that the reduction in oxygen plasma leads to adenylates depletion in muscle and other tissues increasing the production of ammonia which can react with glutamine and glutamate finally forming urea. The elevation of urea in all lethal concentrations, both for ammonia and nitrite, supports the use of this

strategy as a means of detoxification by *L. alexandri*. Thus, urea plasma may be a marker for the diagnosis of such nitrogen poisoning as reported by Peyghan and Azary-Takamy (2002).

Total proteins comprise albumins acting in the maintenance of osmotic equilibrium preventing the fluid outlet of the blood vessels, and globulin which are an important part of the immune system (Mutlu et al., 2015). The evaluation of total protein in fish is important to reflect the plasma volume that can be changed in situations such as nephrotic syndrome (Chen et al., 2002) and liver disease (John, 2007). The measurement of albumin has diagnostic value about the overall nutritional status of the fish, and vascular and liver integrity (Peres et al., 2015). A previous study by Gopal et al. (1997) described that hypoalbuminemia in fish can occur in response to stressful situations, supporting the studies of Ciji et al. (2015) and Zhang et al. (2015) working with the cyprinids *Megalobrama amblycephala* and *Labeo rohita* intoxicated with nitrite and ammonia, respectively. However, the same was not observed by Jia et al. (2016) when exposed the turbot (*Scophthalmus maximus*) to nitrite and was not seen in *L. alexandri* in this study.

The enzymes AST, ALT, CK and ALP are found in many fish tissue (Congleton and Wagner, 2004). As intracellular enzymes, plasma levels enzymes depend on the release rate from damaged cells reflecting the type of damage caused and extent of injury (Kori-Siakpere et al., 2011). The oscillation of AST and GGT in acute exposure to ammonia ( $10.76 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ ) and ALP acute exposure to nitrite (up  $18.78 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^- \text{-N}$ ) can be related to our results indicating liver histopathology. According to Sinha et al. (2012), these biomarkers of effect are considered as significant indicators of tissue damage in fish. These lesions observed in *L. alexandri*, when exposed to ammonia and nitrite acute toxicity tests, corroborate those found by Li et al. (2007) after

exposing the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* to microcystin, terming the swelling of hepatocytes as severe damage can cause necrosis, leading to bleeding and death of the animal.

Olurin et al. (2006) reported that hepatocytes lesions can prevent portal blood flow through the liver and prevent liver function with conversion of glucose into glycogen storage and regulation of lipid and amino acid deamination. In the present study, we observed swelling and vacuolation of hepatocytes for acute exposure to nitrite and ammonia. These histopathological responses are among the most common disorders of the liver, as described by Abdel-Moneim et al. (2012), and are associated with inhibition of protein synthesis, energy depletion or breakdown of microtubules (Ahmed et al., 2013). The commitment of the liver may also interfere with the ammonia detoxification through its transformation into urea via ornithine cycle, as previously described as strategy used by *L. alexandri* against the nitrogenous compounds intoxication.

Another factor that may be related to mortality caused by short-term exposure to nitrogen compounds, would be the development of lesions in the gills of juvenile *L. alexandri*, also demonstrated by Cardoso et al. (1996), who associated the lethality pacamãs exposed to ammonia to changes in morphology and physiology of this organ. The indices related to gill histopathology are tools used to confirm the deterioration of the body exposed to the pollutants contained in the external environment (Mallatt, 1985).

Changes in cellular and tissue structures (e.g. gills and liver), although they are mostly non-specific features (Mallatt, 1985), may be related to contact with contaminants, as described by Jia et al. (2016), disturbing gas exchange, excretion, ionoregulation and osmoregulation, leading to death (Randi et al., 1996). This fact was



corroborated by Cardoso et al. (1996) working with pacamãs exposed to ammonia. The fish presented some histopathologies as epithelium detachment and retraction of superficial cells in primary and secondary lamellae, among other injuries. Detachment of respiratory epithelium and edema probably represent defense mechanisms for increasing the distance between contaminated water and the bloodstream (Abdel-Moneim et al., 2012; Roumieh et al., 2012). The gill aneurysm (telangiectasia) seen in *L. alexandri* was the result acute and subchronic exposure to ammonia and nitrite, as noted Roumieh et al. (2012), possibly occurred because of pillars cells damage, compromising vascular integrity with the release of large amounts of blood forcing the epithelium out. In addition, as an indirect effect, the gill cell swelling and lifting could be related to decline of enzyme  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, reflecting on fish osmoregulatory problems (Ahmed et al., 2013).

Subchronic exposure to  $1.64 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3\text{-N}$  resulted in damage to the gills, as is shown in lesion score, which was accompanied by the increase in lactate indicating the condition of hypoxia in this treatment. Uremia occurred in attempting to avoid poisoning by ammonia. According to Wajsbrodt et al. (1993), histopathologies can affect the function of the gills and liver, contributing to tissue hypoxia. Most blood parameters of animals exposed subchronically to nitrite did not differ from control treatment, with the exception of the hemoglobin level, which may be related with a mild methemoglobinemia at the concentration of  $1.86 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^- \text{-N}$ .

After the detox period, elevated levels of ALT and AST in fish recovering from  $1.64 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3\text{-N}$ , indicated that there was still organ dysfunction (although the enzymology observed was not statistically significant) due to stress caused by cell damage. These concentrations of transaminases have been accompanied by high levels of lactate and urea, confirming the attempt to detoxification (Randall and Tsui, 2002),

and use of alternative routes for energy via lactate. We noted a reduction in the degree of lesion extension in the gill and liver tissues after the period of recovery.

## 5 CONCLUSION

The “pacamã” showed moderate tolerance to ammonia and nitrite and can survive during short peaks of these nitrogen compounds when in intensive production systems. Security levels found are reliable for the species according to the responses evaluated, but more information is needed.

The nitrogenous compounds when at high concentrations generated irreversible damage to gill tissue and liver. In subchronic concentrations, ammonia and nitrite were less harmful. Ammonia and nitrite may have negatively influenced the fish metabolism by catabolic pathways mobilize their energy reserves. The recovery period after subchronic exposure to ammonia and nitrite can be considered sufficient for the resumption of *L. alexandri* homeostasis, since gill and liver tissues showed a significant recovery of their integrity.

Lethal susceptibility, histopathological biomarkers and effect biomarkers (blood parameters) are very realistic approaches to explain the intoxication by nitrogenous compounds.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank CNPq, FAPEMIG, CAPES for supporting this research. Kleber Campos Miranda Filho and Ronald Kennedy Luz are research fellows of Brazilian CNPq (305577/2013-1 and 305913/2012-3). The experiments followed protocols approved by CEUA/UFMG - Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais, Protocol 70.

## 6 REFERENCES

- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., Elmenshawy, O.M., 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted environments, Saudi Arabia. *Chemosphere* 88, 1028-1035.
- Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M.H., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., 2013. Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Exper. Toxicol. Pathol.* 65, 903-909.
- ASTM, American Standards for Testing and Materials, 2002. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians (ASTM E729-96). ASTM, Philadelphia, PA, pp. 1-22.
- Atwood, H.L., Fontenot, Q.C., Tomasso, J.R., Isely, J.J., 2001. Toxicity of nitrite to Nile tilapia: Effect of fish size and environmental chloride. *N Am. J. Aquacult.* 63, 49-51.
- Avilez, I.M., Aguiar, L.H., Altran, A.E., Moraes, G., 2004. Acute toxicity of nitrite to matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869), (Teleostei-Characidae). *Cienc. Rural* 34, 1753-1762.
- Barbieri, E., Bondioli, C.V., 2015. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquacult. Res.* 46, 565-571.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Fagundes, M., Lacerda, L.A., Terra, S., 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquacult. Res.* 34, 1465-1469.
- Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrometric method for the determination of nitrite in the sea water. *J. Mar. Res.* 11, 87-96.
- Benli, A.Ç.K., Köksal, G., 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae e fingerlings. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 339-344.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-34.

- BioBrasil, 2014. Efetividade das ações de conservação de peixes ameaçadas de extinção. BioBrasil - Biodiversidade Brasileira, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
- Boyd, C.E., 2015. Water quality an introduction, 2<sup>nd</sup> edition. Springer International Publishing, Switzerland.
- Cardoso, E.L., Chiarini-Garcia, H., Ferreira, R.M.A., Poli, C.R., 1996. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. J. Fish Biol. 49, 778-787.
- Chen, Y., Wooster, G.A., Getchell, R.G., Bowser, P.R., Timmons, M.B., 2002. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis - affected and ozone- treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. Aquaculture 218, 89-102.
- Ciji, A., Sahu, N.P., Pal, A.K., Akhtar, M.S., 2015. Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. Aquacult. Res. 46, 2013-2024.
- Colt, J.; Armstrong, D., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusc. In: Allen, L; Kinney, E. Proceedings of the bioengineering symposium for fish culture. Fish Culture Section of the American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- Colt, J., Tchobanoglous, G., 1976. Evaluation of the short-term toxicity of nitrogenous compounds to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 8, 209-224.
- Congleton, J.L., Wagner, T., 2006. Blood-chemistry indicators of nutritional status in juvenile salmonids. J. Fish Biol. 69, 473-490.
- Costa, D.C., Silva, W.S., Melillo-Filho, R., Miranda-Filho, K.C., Santos, J.C.E., Luz, R.K., 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. Anim. Reprod. Sci. 54, 148-154.
- Costa, D.P., Leme, F.O.P., Takata, R., Costa, D.C., Souza e Silva, W., Melillo-Filho, R., Alves, G.M., Luz, R.K., 2016. Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juvenile of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. Aquacult. Res. 47, 1706-1715.
- Costa, O.T.F., Ferreira, D.J.S., Mendonça, F.L.P., Fernandes, M.N., 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. Aquaculture 232, 627-636

- Diaz-Quiroz, J.F., Echeverri, K., 2013. Spinal cord regeneration: where fish, frogs and salamanders lead the way, can we follow? *Biochem. J.* 451(3),353-364.
- Diricx, M., Sinha, A.K., Liew, H.J., Mauro, N., Blust, R., 2013. Compensatory responses in common carp (*Cyprinus carpio*) under ammonia exposure: Additional effects of feeding and exercise. *Aquat. Toxicol.* 142, 123-137.
- El-Shafai, S.A., El-Gohary, F.A., Nasr, F.A., van der Steen, N.P., Gijzen, H.J., 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 232, 117-127.
- El-Sherif, M.S., El-Feky, A.M., 2008. Effect of ammonia on Nile tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures. 8<sup>th</sup> International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008 Cairo, Egito. 513-530.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.* 283, 641-652.
- Evans, J.J., Park, D., Brill, G.C., Klesius, P.H., 2006. Un-ionized ammonia exposure in Nile tilapia: toxicity, stress response, and susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. *N. Am. J. Aquacult.* 68, 23-33.
- Filho, R.M., Takata, R., Santos, A.E.H., Souza e Silva, W., Ikeda, A.L., Rodrigues, L.A., Santos, J.C.E., Salaro, A.L., Luz, R.K., 2014. Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. *Aquacult. Res.* 45, 1913-1920.
- Fu, C., Cao, Z.D., Fu, S.J., 2013. The effects of caudal fin loss and regeneration on the swimming performance of three cyprinid fish species with different swimming capacities. *J. Exp. Biol.* 216, 3164-3174.
- Gomes, L.C., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A.R.M., Chipari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Urbinati, E.C., 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquacult. Soc.* 34, 76-84.
- Gopal, V., Parvathy, S., Balasubramanian, P.R., 1997. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bioindicator of pollution stress. *Environ. Monit. Assess.* 48, 117-124.
- Grosell, M., Jensen, F.B., 2000. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* 50, 97-107.

- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714-719.
- Handy, R.D., Poxton, M.G., 1993. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 3, 205-241.
- Hasan, M.R., Macintosh, D.J., 1986. Acute toxicity of ammonia to common carp fry. *Aquaculture* 54, 97-107.
- Hegazi, M.M., Attai, Z.I., Hegazi, M.A.M., Hasanein, S.S., 2010. Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain. *Aquaculture* 299, 149-156.
- Huertas, M., Gisbert, E., Rodrigues, A., Cardona, L., Williot, P., Castelló-Orvay, F., 2002. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC<sub>50</sub>) determination, hematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquat. Toxicol.* 57, 275-266.
- Israeli-Weinstein, D., Kimmel, E., 1998. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. *Aquaculture* 165, 81-93.
- Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135, 9-24.
- Jia, R., Liu, B.L., Han, C., Huang, B., Lei, J.L., 2016. The physiological performance and immune response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) to nitrite exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 181, 40-46.
- John, P.J., 2007. Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus viitatus* after chronic exposure to Metasystox and Sevin. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 15-20.
- Kori-Siakpere, O., Ikomi, R.B., Ogbe, M.G., 2011. Biochemical response of the African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to sublethal concentrations of potassium permanganate. *Ann. Biol. Res.* 2, 1-10.
- Kroupova, H., Machova, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Smutna, M., 2006. The ability of recovery in common carp after nitrite poisoning. *Vet. Med. - Czech* 51, 423-431.
- Lewis, J.W., Morris, D.P., 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans. Am. Fish Soc.* 115, 183-195.

- Li, L., Xie, P., Li, S., Qiu, T., Guo, L., 2007. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced *in vivo* by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 357-367.
- Li, M., Gong, S., Li, Q., Yuan, L., Meng, F., Wang, R., 2016. Ammonia toxicity induces glutamine accumulation, oxidative stress and immunosuppression in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1(6), 183-184.
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 42, 630-646.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M., 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133, 151-160.
- Martinez, C.B.R., Azevedo, F., Winkaler, E.U., 2006. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais, in: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C. (Eds.), *Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, pp. 81-95.
- Miranda-Filho, K.C., Costa, L.D.F., 2016. Deleterious effects of ammonia and nitrite to fish and crustaceans, chapter 26, in: Tavares-Dias, M., Mariano, W.S. (Eds.), *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*, Vol. 2. São Carlos: Pedro & João Editores, pp. 545-578.
- Miranda-Filho, K.C., Pinho, G.L.L., Wasielesky, W.J., Bianchini, A., 2009. Long-term ammonia toxicity to pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 150, 377-382.
- Mommsen, T.P., Danulat, E., Walsh, P.J., 1992. Metabolic actions of glucagon and dexamethasone in liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85, 316-326.
- Moraes, G., Avilez, I.M., Hori, T.S.F., 2006. Comparison between biochemical responses of the teleost pacu and its hybrid tambacu (*Piraractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) to short term nitrite exposure. *Braz. J. Biol.* 66(4), 1103-1108.
- Muir, J.F., 1982. Recirculated water system in aquaculture. In: J.E. Muir and R.J. Roberts (Editors). *Recent Advances in Aquaculture*, Vol. II. Westview Press, Boulder, Colorado; p. 358- 446.

- Mutlu, E., Aydin, S., Kutlu, B., 2015. Alterations of growth performance and blood chemistry in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) affected by copper sulfate in long-term exposure. *Turk. J. Fish Aquat Sci.* 2(15), 487-493.
- Olurin, K.B., Olojo, E.A.A., Mbaka, G.O., Akindele, A.T., 2006. Histopathological response of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide glyphosate. *Afr. J. Biotechnol.* 5(24), 2480-2487.
- Park, I.S., Lee, J., Hur, J.W., Song, C.Y., 2007. Acute toxicity and sublethal effects of nitrite on selected hematological parameters and tissues in dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*. *J. World Aquacult. Soc.* 38(2), 188-198.
- Peres, B.H., Costas, B., Perez-Jimenez, A., Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., 2015. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. *J. Appl. Ichthyol.* 31:65-71.
- Peyghan, R., Azary-Takamy, G., 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. *Aquacult. Int.* 10, 317-325.
- Piedras, S.R.N., Pouey, J.L.O.F., Moraes, P.R.R., Cardoso, D.F., 2006. Lethal concentration (CL<sub>50</sub>) of un-ionized ammonia for pejerrey larvae in acute exposure. *Sci. Agric.* 63, 184-186.
- Pungrasmi, W., Phinitthanaphak, P., Powtongsook, S., 2016. Nitrogen removal from a recirculating aquaculture system using a pumice bottom substrate nitrification-denitrification tank. *Ecol. Eng.* 95, 357-363.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17-23.
- Randi, A.S., Monserrat, J.M., Rodriguez, E.M., Romano, L.A., 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). *J. Fish Dis.* 19, 311-322.
- Roumieh, R., Barakat, A., Abdelmeguid, N., Ghanawi, J., Saoud, P., 2012. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskal 1775). *Aquacult. Res.* 44, 1777-1790.
- Siikavuopio, S.I., Sæther, B.S., 2006. Effects of chronic nitrite exposure on growth in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 255, 351-356.



- Sinha, A.K., Liew, H.J., Diricx, M., Blust, R., De Boek, G., 2012. The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in gold fish (*Carassius auratus L.*). *Aquat. Toxicol.* 109, 33-46.
- Small, B.C., 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture* 238, 469-481.
- Smutná, M., Vorlová, L., Svobodová, Z., 2002. Pathobiochemistry of ammonia in the internal environment of fish. *Acta Vet. BRNO* 71, 169-181.
- Sprague, J.B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish-III. Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Res.* 5, 245-266.
- Staurnes, M., Rainuzzo, J.R., Sigholt, T., Jørgensen, L., 1994. Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: stress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase activity. *Comp. Biochem. Physiol. A* 109, 413-421.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Drastichová, J., Groch, L., Lusková, V., Poleszczuk, G., Velísek, J., Kroupová, H., 2005a. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. *Aquacult. Res.* 36, 1177-1184.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Poleszczuk, G., Huda, J., Hamáckova, J., Kroupová, H., 2005b. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *Acta Vet. BRNO* 74, 129-137.
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., 2013. *Recirculating aquaculture*, 3<sup>rd</sup> ed. Ithaca Publishing Company, NY.
- Tomasso, J.R., 1986. Comparative toxicity of nitrite to freshwater fishes. *Aquat. Toxicol.* 8, 129-137.
- Tucker, C.S., Francis, F.R., Bealeu, M.H., 1989. Nitrite-induced anemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 295-301.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol. C* 116, 89-95.
- Vijayavel, K., Rani, E.F., Anbuselvam, C., Balasubramanian, M.P., 2006. Interactive effect of monocrotophos and ammonium chloride on the freshwater fish

- Oreochromis mossambicus* with reference to lactate/pyruvate ratio. Pestic. Biochem. Physiol. 86, 157-161.
- Wagner, T., Congleton, J.L., 2004. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 61, 1066-1074.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Diamant, A., Popper, D.M., 1993. Chronic toxicity of ammonia to juvenile seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. J. Fish Biol. 42, 321-328.
- Walsh, P.J., Bergman, H.L., Narahara, A., Wood, C.M., Wright, P.A., Randall, D.J., Maina, J.N., Laurent, P., 1993. Effects of ammonia on survival, swimming, and activities of enzymes of nitrogen metabolism in the lake Magadi tilapia *Oreochromis alcalicus grahami*. J. Exper. Biol. 180, 323-387.
- Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591-625.
- Wilkie, M.P., Wood, C.M., 1996. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. Comp. Biochem. Physiol. B 113, 665-673.
- Yanbo, W., Wenju, Z., Weifen, L., Zirong, X., 2006. Acute toxicity of nitrite to tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. Fish Physiol. Biochem. 32, 49-54.
- Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2008. Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações. Ed. Rima, São Paulo.
- Zhang, B.L., Xiong, D.M., Zhao, Z.G., Fang, W., Yang, K., Fan, Q.X., 2012. Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). J. Appl. Ichthyol. 28, 82-86.
- Zhang, C.N., Li, X.F., Tian, H.Y., Zhang, D.D., Jiang, G.Z., Lu, K.L., Liu, G.X., Liu, W.B., 2015. Effects of fructooligosaccharide on immune response, antioxidant capability and HSP70 and HSP90 expressions of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) under high ammonia stress. Fish Physiol. Biochem. 41, 203-217.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui se que a tolerância do pacamã aos compostos nitrogenados aumenta com o aumento da idade e do tamanho da larva e em ambiente salinizado (2‰). Neste estudo, constatamos também que a toxicidade não se diferenciou nas três temperaturas testadas, e os compostos nitrogenados mesmo em baixas concentrações podem causar a perda de 50% da população em um curto período de tempo.

O pacamã mostrou tolerância moderada à amônia e ao nitrito e pode sobreviver durante picos curtos destes compostos nitrogenados quando em sistemas de produção intensiva. Os níveis de segurança encontrados são confiáveis para as espécies de acordo com as respostas avaliadas, mas são necessárias mais informações.

Os compostos nitrogenados quando em altas concentrações geraram danos irreversíveis ao tecido branquial e ao fígado. Em concentrações subcrônicas, amônia e nitrito foram menos prejudiciais. Amônia e nitrito podem ter influenciado negativamente o metabolismo do peixe por caminhos catabólicos ao mobilizar suas reservas de energia. O período de recuperação após exposição subcrônica a amônia e nitrito pode ser considerado suficiente para a retomada da homeostase de *L. alexandri*, uma vez que os tecidos branquiais e hepáticos apresentaram recuperação significativa da sua integridade.

A susceptibilidade letal, biomarcadores histopatológicos e biomarcadores de efeito (parâmetros sanguíneos) são abordagens muito realistas para explicar a intoxicação por compostos nitrogenados.