

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

Efeito letal da amônia e do nitrito nas fases iniciais da vida do *Betta splendens*

Renata Rodrigues Sampaio

**BELO HORIZONTE
2017**

RENATA RODRIGUES SAMPAIO

Efeito letal da amônia e do nitrito nas fases iniciais da vida do *Betta splendens*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Kleber Campos Miranda Filho

**BELO HORIZONTE
2017**

Agradecimentos

Agradeço a Deus, que sempre iluminou e guiou os meus passos pela vida.

Quero expressar meus sinceros agradecimentos e profundo reconhecimento a todos aqueles Que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho:

A Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade dos conhecimentos científicos; A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

Aos meus pais Maria Antônia e Geraldo e irmãos Luciana e Gladson, que me deram apoio e sempre confiaram em mim.

Aos meus sogros Luzia e Geraldo e a “tia” Eni pelo carinho e tantas palavras de incentivo. A minha querida cunha (Alessandra) que com sua risada alegra os meus dias!

Ao meu esposo Wagner, agradeço o apoio e carinho recebido, além da compreensão pelas dificuldades, momentos angustiantes e ausência que lhe proporcionei.

A TODA equipe do laboratório de maricultura, em especial a Stella Rubim (amiga para todas as horas, presente em todos os momentos), Luanna Neves (impossível descrever a doçura e o auxílio concedido nos momentos difíceis), João Paulo Lorenzini, Franklim Batista e Márcio José Santos pelo apoio e ajuda para realização deste projeto. Ao querido Raphael Bahiense pelos ensinamentos, carinho e dedicação para a produção deste estudo. A professora Daniela Chemim de Melo que sempre esteve disponível e disposta a contribuir com o presente trabalho. As minhas queridas e amadas amigas Angélica e Stella um agradecimento especial pela ajuda incondicional, o que tornou cada dia de trabalho mais agradável, fundamental para realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

Aos professores, Luciano dos Santos Rodrigues e Kleber Campos Miranda Filho pela orientação científica, incentivo, apoio, disponibilidade e em especial a confiança depositada na realização deste trabalho. São os meus mais sinceros respeito e admiração pelo exemplo de profissional e pessoa. Ao LAQUA pela colaboração, a técnica Érika Alvarenga pela disponibilidade e prazer em compartilhar seu conhecimento.

Obrigada!

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
(Madre Teresa de Calcutá)

SUMÁRIO

	Resumo.....	10
	Abstract.....	11
	Introdução geral.....	12
1.	Referencial teórico.....	13
2.1.	Espécie estudada <i>Betta splendens</i>	13
2.2.	Compostos nitrogenados – Qualidade da água.....	16
2.3.	Testes de Toxicidade e estudo histológico.....	19
3.	Referências bibliográficas.....	23
4.	Objetivos.....	29
4.1.	Objetivo geral.....	29
4.2.	Objetivos específicos.....	29
ARTIGO	Efeito letal da amônia e do nitrito nas fases iniciais de vida do <i>Betta splendens</i>.....	30
	Resumo.....	30
	Abstract.....	30
1.	Introdução.....	31
2.	Material e métodos.....	32
2.1.	Instalações e Condições Experimentais.....	32
2.2.	Teste de alimentação com <i>Betta splendens</i>	33
2.3.	Testes de toxicidade aguda – CL ₅₀	34
2.3.1.	Teste de toxicidade aguda com amônia e nitrito- animais de 7, 21 e 45 dias de vida.....	35
2.4.	Análise da água.....	36
2.5.	Cálculo da amônia não ionizada.....	36
2.6.	Estudo histológico.....	37
2.7.	Análise Estatística.....	38
3.	Resultados.....	38
4.	Discussão.....	52
5.	Conclusão.....	62
6.	Considerações finais.....	62
7.	Referências bibliográficas.....	63

LISTAS DE TABELA

ARTIGO : Efeito letal da amônia e do nitrito nas fases iniciais de vida do *Betta splendens*

- Tabela 1. Alimentação fornecida às formas jovens de *Betta splendens* diariamente durante os testes de toxicidade aguda com compostos nitrogenados. Adaptado de Lombardi e Gomes (2008); Schütz et al. (2008).....34
- Tabela 2. Concentrações de amônia e nitrito utilizadas durante os experimentos de toxicidade aguda.....35
- Tabela 3. Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto ao tipo das lesões e dos estágios em que se inserem. Adaptada de Poleksic & Mitrovic-Tutundžic (1994).....38
- Tabela 4. Médias de temperatura, oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico (pH) e alcalinidade (mg. L-1 de Ca CO₃) nos tratamentos de toxicidade aguda da amônia e do nitrito em *Betta splendens* durante 96h de teste.....39
- Tabela 5. Valores médios da concentração nominal e real para a amônia total (N-NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂⁻) durante 96h de experimento de toxicidade aguda com *Betta splendens* sete dias de vida.....40
- Tabela 6. Valores médios da concentração nominal e real para amônia total (N- NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂⁻) durante 96h de experimento de toxicidade aguda com *Betta splendens* com 21 dias de vida.....40
- Tabela 7. Valores médios da concentração nominal e real para a amônia total (N- NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂⁻) durante 96h de experimento de toxicidade aguda com *Betta splendens* com 45 dias de vida.....40
- Tabela 8. Percentual de mortalidade (%) do *Betta splendens* com 7 dias de vida exposta a várias concentrações de amônia total durante 96 h e valores de CL₅₀ de amônia total e gasosa e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.....41
- Tabela 9. Percentual de mortalidade (%) do *Betta splendens* com 7 dias de vida exposta a várias concentrações de nitrito durante 96 h e valores de CL₅₀ de nitrito e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.....41
- Tabela 10. Percentual de mortalidade (%) do *Betta splendens* com 21 dias de vida

	exposta a várias concentrações de amônia total durante 96 h e valores de CL ₅₀ de amônia total e gasosa e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.....	41
Tabela 11.	Percentual de mortalidade (%) do <i>Betta splendens</i> com 21 dias de vida exposta a várias concentrações de nitrito durante 96 h e valores de CL ₅₀ de nitrito e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.....	42
Tabela 12.	Percentual de mortalidade (%) do <i>Betta splendens</i> com 45 dias de vida exposta a várias concentrações de amônia total durante 96 h e valores de CL ₅₀ de amônia e gasosa total e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.....	42
Tabela 13.	Percentual de mortalidade (%) do <i>Betta splendens</i> com 45 dias de vida exposta a várias concentrações de nitrito durante 96 h e valores de CL ₅₀ de nitrito e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.....	42
Tabela 14.	Níveis de Segurança de amônia total, amônia não ionizada e nitrito para <i>Betta splendens</i> em três diferentes idades.....	42
Tabela 15.	Alterações histológicas encontradas nas brânquias de <i>Betta splendens</i> expostas as crescentes concentrações de Amônia.....	43
Tabela 16.	Alterações histológicas encontradas nas brânquias de <i>Betta splendens</i> expostas as crescentes concentrações de nitrito.....	44
Tabela 17.	Diferentes resultados de CL ₅₀ (nitrito) de acordo com os parâmetros, peso, tamanho, temperatura e pH.....	53
Tabela 18.	Diferentes resultados de CL ₅₀ (amônia) de acordo com os parâmetros, peso, tamanho, temperatura e pH.....	54

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos adultos de *Betta splendens*, **A, B, C**: machos. **D, E, F**: fêmeas.....14

ARTIGO : Efeito letal da amônia nas fases iniciais de vida do *Betta splendens*

Figura 1.	Caixas de manutenção dos animais.	33
Figura 2.	Animal de sete dias alimentado uma vez ao dia.....	34
Figura 3.	Estufas de DBO utilizadas durante o experimento.....	35
Figura 4.	Animais coletados e preparados para histologia em microscopia ótica.....	37
Figura 5.	Fotomicrografias de brânquia de juvenis de <i>Betta splendens</i> com 7, 21 e 45 dias de vida expostos a concentrações agudas de amônia de 24 a 96 h. Coloração hematoxilina, eosina.....	46
Figura 6.	Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe <i>Betta splendens</i> . Animais de 21 dias expostos ao tratamento com 95 mg/L N-AT.....	47
Figura 7.	Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe <i>Betta splendens</i> animais de 45 dias de vida tratados com 165mg/L N-AT.....	47
Figura 8.	Fotomicrografias de brânquia de juvenis de <i>Betta splendens</i> om 7, 21 e 45 dias de vida expostas a diferentes concentrações de N-NO ₂ durante 96h de teste agudo. Coloração hematoxilina, eosina.....	48
Figura 9.	Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe <i>Betta splendens</i> animais de 45 dias de vida tratados com 280 mg/L N-NO ₂	50
Figura 10.	Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe <i>Betta splendens</i> animais de 45 dias de vida tratados com 280 mg/L N-NO ₂	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CL ₅₀	Concentração Letal Mediana
N-NH ₃ + NH ₄ ⁺	Amônia total
N-NH ₃	Amônia não ionizada
N-NO ₂ ⁻	Íon Nitrito
°C	Graus Celsius
mg/L	Miligramas por litro
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MeHb	Metahemoglobina
OD	Oxigênio dissolvido
P.A.	Reagente com qualidade para análise
pH	Potencial hidrogeniônico de uma solução aquosa quanto à acidez, neutralidade, e alcalinidade
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais

Lethal effect of ammonia and nitrite in the early life stages of *Betta splendens*.

Resumo

A presença de compostos nitrogenados dentro dos sistemas de produção aquícola tem ganhado importância atualmente, a falta de conhecimento dos limites de tolerância da espécie produzida a esses compostos pode ocasionar grandes prejuízos ao final do cultivo. Assim, o presente estudo objetivou identificar os valores de CL_{50} (96h) para o peixe ornamental *Betta splendens* em três diferentes idades, 7, 21 e 45 dias de vida, expostos a concentrações crescentes de amônia total 0, 35, 42, 50, 65 e 80 mg-L; 0, 50, 65, 80, 87 e 95 mg-L; 0, 125, 135, 145, 155 e 165 mg-L respectivamente e crescentes concentrações de nitrito, 0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg-L; 0, 50, 75, 100, 125 e 175 mg-L; 0,120, 160, 200, 240 e 280 mg-L respectivamente e estimar o nível de segurança dos compostos nitrogenados para esta espécie. O experimento foi realizado em sistema semi-estático e cada tratamento foi realizado em duplicata. 10 peixes de 7 dias foram mantidos em béqueres de 1 L por 96 h, em temperatura aproximada de $28 \pm 0,15$ °C; pH $7,2 \pm 0,2$; oxigênio $5,9 \pm 0,28$ mg/L; alcalinidade $77,5 \pm 10,60$ mg/L. 10 animais nos experimentos com *Betta* de 21 e 45 dias de vida, onde os mesmos foram mantidos em béqueres de 2L por 96 h temperatura $28,1 \pm 0,11$ °; $28 \pm 0,13$ °C, pH $6,9 \pm 0,4$; $6,9 \pm 0,1$, oxigênio $6,2 \pm 0,23$; $6,7 \pm 0,27$ mg/L, alcalinidade $85,7 \pm 12,0$; $79,5 \pm 9,45$ mg/L respectivamente. Para a estimativa das concentrações letais medianas CL_{50} (96h) foi utilizado o programa “Trimmed Spearman Karber method”. Durante o experimento animais foram coletados para análise histológica nas diferentes concentrações testadas e foram analisados em microscopia ótica e de varredura. As CL'_{50} para as idades 7, 21 e 45 dias foram estimadas para amônia como sendo em, 36,87 mg/L ; 61,19 mg/L ; 132,94 mg/L respectivamente e para nitrito como sendo - 141,96 mg/L $N-NO_2^-$. Foi possível observar alterações histológicas nas brânquias dos animais nas diferentes concentrações testadas. O estudo histopatológico revelou alterações frequentes nas três diferentes idades da espécie estudada. Os danos mais frequentes foram: elevação epitelial, hiperplasia, hipertrofia e fusão lamelar das células epiteliais. Por meio dos resultados encontrados pode-se concluir que o peixe ornamental *Betta splendens* é muito tolerante aos compostos nitrogenados e a incidência das alterações histopatológicas nas brânquias indicam o comprometimento dos animais quando expostos a altas concentrações de compostos nitrogenados na água.

Palavras-chave: Compostos nitrogenados, peixe ornamental, qualidade da água, toxicidade.

Lethal effect of ammonia in the early life stages of *Betta splendens*.

Abstract

The presence of nitrogen compounds within aquaculture production systems has gained importance today, the lack of knowledge of the limits of tolerance of the species produced to these compounds can cause great damages at the end of the crop. Thus, the present study aimed to identify the LC50 values (96h) for ornamental *Betta splendens* at three different ages, 7, 21 and 45 days of life, exposed to increasing concentrations of total ammonia 0, 35, 42, 50, 65 And 80 mg-L; 0, 50, 65, 80, 87 and 95 mg-L; 0, 125, 135, 145, 155 and 165 mg-L respectively and increasing concentrations of nitrite, 0, 25, 50, 75, 100 and 125 mg-L; 0, 50, 75, 100, 125 and 175 mg-L; 0.120, 160, 200, 240 and 280 mg-L respectively and to estimate the safety level of the nitrogen compounds for this species. The experiment was performed in a semi-static system and each treatment was performed in duplicate. 10 7-day fish were kept in beakers of 1 L for 96 h at a temperature of approximately 28 ± 0.15 ° C; PH 7.2 ± 0.2 ; Oxygen 5.9 ± 0.28 mg-L; Alkalinity 77.5 ± 10.60 mg / L. 10 animals in the *Betta* experiments of 21 and 45 days of life, where they were kept in beakers of 2L for 96 h temperature $28,1 \pm 0,11$ °; 28 ± 0.13 ° C, pH 6.9 ± 0.4 ; 6.9 ± 0.1 , oxygen 6.2 ± 0.23 ; 6.7 ± 0.27 mg / L, alkalinity 85.7 ± 12.0 ; 79.5 ± 9.45 mg / L respectively. The "Trimmed Spearman Karber method" program was used to estimate the median lethal concentrations LC50 (96h). During the experiment animals were collected for histological analysis at the different concentrations tested and were analyzed by optical and scanning microscopy. The CL'50 for the ages 7, 21 and 45 days were estimated for ammonia as being at, 36.87 mg / L; 61.19 mg / L; 132.94 mg / L respectively and for nitrite as - 141.96 mg / L N-NO₂-. It was possible to observe histological changes in the gills of the animals in the different concentrations tested. The histopathological study revealed frequent alterations in the three different ages of the studied species. The most frequent damages were: epithelial elevation, hyperplasia, hypertrophy and lamellar fusion of the epithelial cells. By means of the results, it can be concluded that the *Betta splendens* ornamental fish is very tolerant to the nitrogen compounds and the incidence of the histopathological changes in the gills indicate the animals' compromise when exposed to high concentrations of nitrogenous compounds in the water.

Keywords: Nitrogen compounds, ornamental fish, water quality, toxicity.

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com dados do Boletim Estatístico do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010; 2011), o Brasil produziu perto de 1,25 milhões de toneladas de pescado. A atividade foi responsável por um PIB de aproximadamente R\$ 5 bilhões.

O comércio de peixes ornamentais vem se expandindo rapidamente com o aumento na demanda mundial (Lima et al., 2001; Vidal Junior, 2007). De acordo com dados do SEBRAE (2015), o Brasil exportou um volume de 74.972 toneladas que representou uma receita de US\$ 10.813,890 de peixes ornamentais em 2013.

De acordo com Zuanon (2011) uma das principais causas de doenças e mortalidade em sistema de criação de peixes ornamentais é o estresse provocado pela qualidade da água. Ainda de acordo com o mesmo autor a maioria dos sistemas de criação de peixes ornamentais utilizado no Brasil tem como característica a baixa renovação de água. Esse tipo de sistema quando não bem monitorado pode ocasionar variações bruscas na qualidade da água e favorecer uma condição de estresse para o animal.

A sensibilidade a contaminantes existente no meio aquático é diferente para cada espécie e para cada fase de desenvolvimento do animal (Ribeiro et al., 2009). Dessa forma, os testes de toxicidade e as análises físico químicas se complementam (Costa, 2008).

Segundo Nakatani et al. (2001) as estratégias de desenvolvimento dos peixes muda conforme o meio em que habitam. O peixe *Betta splendens* é conhecido por tolerar condições com baixos teores de oxigênio dissolvido, o órgão responsável por esta característica é chamado labirinto e permite que o animal respire o oxigênio atmosférico (Wolfsheimer, 2003; Boumendjel, 2006; Faria et al., 2006). A formação do labirinto ocorre normalmente entre o 14° ao 28° dia de vida (Damazio, 1992). Assim, a qualidade da água deve ser monitorada diariamente para não comprometer o desenvolvimento do órgão labirinto e o crescimento do animal.

De acordo com o que fora relatado, o objetivo do trabalho foi demonstrar o efeito causado sobre a sobrevivência do *Betta splendens* em três diferentes idades (com o órgão labirinto sem formação, em formação e já formado) quando expostos a diferentes concentrações de amônia e nitrito, assim como possíveis alterações nos tecidos branquiais dos animais utilizados nesse estudo buscando demonstrar o efeito destes compostos na criação dessa espécie ornamental.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - A Espécie estudada _ *Betta splendens*

Dentre as espécies ornamentais produzidas no Brasil, o *Betta splendens* conhecido como beta ou peixe de briga, e no exterior como “Siamese fighting fish”, destaca-se no mercado de peixes ornamentais pela beleza, variedade de cores, fácil reprodução e por sua rusticidade (Chapman et al., 1997). O cultivo de beta pelos aquaríofistas no Brasil iniciou a partir da década de 1950 no Rio de Janeiro e em São Paulo (Faria et al., 2006).

O beta é produzido em vários estados brasileiros devido ao clima tropical, à abundância de água e por ser de custo relativamente baixo (Luz, 2002). A temperatura é especialmente importante para a produção de betas (27°C), construção de ninhos e para o comportamento reprodutivo de machos e fêmeas (Gordon e Axelrod, 1968).

Esta espécie ornamental é uma das cinco mais importadas pelos Estados Unidos da América, tanto em número de peixes como em dólares gastos anualmente, o que torna cada vez mais necessário o emprego de novas tecnologias de manejo, para aproveitamento deste nicho de mercado no Brasil (Ferreira, 2007).

Segundo Gouveia Jr et al. (2007) *B. splendens* é oriundo dos países asiáticos que têm como característica plantações de arroz com águas estagnadas e baixo teor de oxigênio dissolvido. De acordo com os mesmos autores o *B. splendens* vive nessas águas e foi classificado pelo ictiólogo inglês Charles Tate Regan no ano de 1910. Segundo Monvises et al. (2009), *B. splendens* (O esplêndido combatente) era muito comercializado na Tailândia e em outros países vizinhos por causa da natureza competitiva do macho. Existiam nesses países muitas apostas entre os admiradores da espécie que assistiam ao combate entre dois machos, com lutas muitas vezes resultando em morte. O mercado para esse tipo de peixe mudou muito. Entretanto, o destaque da criação na Tailândia e países vizinhos passou a ser o comércio ornamental, pois, além das questões éticas, mostrou-se um mercado com margens de lucros mais elevadas (Departamento de Pesca da Tailândia, 2000, 2005). Ainda de acordo com Monvises et al. (2009), as variedades de *Betta* selvagens são avidamente procuradas e têm preços elevados no mercado, porém os animais criados em cativeiro é que trazem variedades comerciais e representam a maior parcela de exportação.

O *B. splendens* pertence à família Belontiidae e à Subordem Anabantoidei, cuja característica principal é a existência de um órgão acessório, localizado na parte superior de seu tórax, chamado de labirinto, que permite que o animal respire o oxigênio atmosférico

(Faria et al., 2006). Sua principal característica pode ter sido a causa de sua adaptação a condições que seriam poucos favoráveis a outras espécies. Essa característica diminui possíveis problemas com a falta de oxigenação na água além de facilitar o manejo (Aguire, 1998).

No período pós-eclosão em que a larva ainda não possui o labirinto desenvolvido a oxigenação da água se faz necessária (Damazio, 1992).

Os betas são sexualmente dimórficos, os machos além de apresentarem muitas cores, são maiores e apresentam nadadeiras bem desenvolvidas e coloridas os tornando preferido comercialmente (Jaroensutasinee e Jaroensutasinee, 2001a) (Fig 1). O *B. splendens* é uma espécie ovípara, o cuidado parental é realizado pelo macho, e ao final do ritual de acasalamento, após a postura dos ovos, a fêmea deve ser retirada, pois o macho se torna altamente agressivo podendo até matar sua companheira (Damazio, 1992). Nos dois primeiros dias de vida, as larvas não apresentam um bom controle de natação, seja vertical ou horizontal, podendo ocorrer o desprendimento do ninho provocando seu afundamento e provável mortalidade. Essa é outra responsabilidade do macho, que se encarrega de auxiliar na fixação das larvas ao ninho de bolhas (Wolfsheimer, 2003).

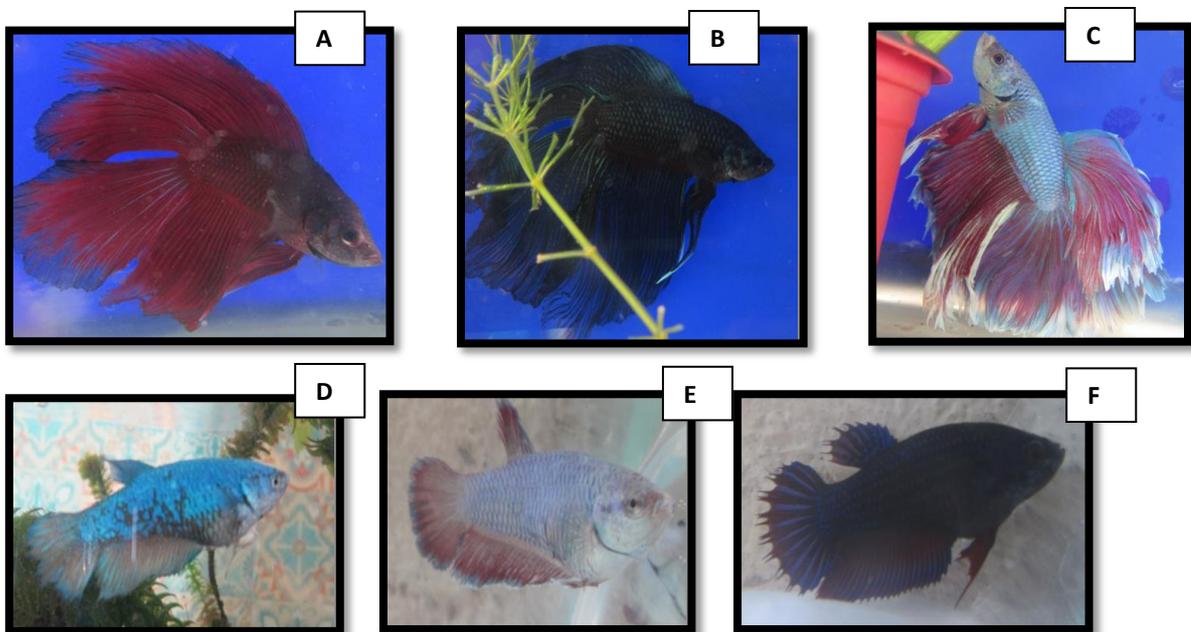


Figura 1. Exemplos adultos de *Betta splendens*, **A, B, C:** machos. **D, E, F:** fêmeas. (Fonte: Próprio autor)

O labirinto é considerado um órgão respiratório auxiliar, se localiza atrás do opérculo e é recoberto por uma membrana muito irrigada de sangue. Quando o beta capta o ar

atmosférico este é imediatamente comprimido no labirinto passando o oxigênio nele contido diretamente para a corrente sanguínea, em seguida uma bolha é expulsa com gases como resultado da respiração (Damazio, 1992; Nelson, 2006).

Mudanças na qualidade da água como a presença de algum contaminante ou poluente podem ocasionar a má formação do labirinto (Wolfsheimer, 2003). Dessa forma, o monitoramento dos parâmetros de qualidade de água devem ser realizados frequentemente, principalmente nas fases iniciais de vida do beta, pois a formação do labirinto ocorre entre o 14° ao 28° dia portanto, nesse período sua respiração é semelhante à de outros peixes (Ramnarine et al., 1987; Damazio, 1992; Phillips et al., 1998).

A precocidade sexual é uma característica do beta, os machos estão aptos à reprodução com aproximadamente 1 a 2 meses de idade, eles constroem ninhos de bolhas na superfície do aquário. As fêmeas quando maduras sexualmente apresentam o ventre mais arredondado e a saída do canal urogenital saliente (James e Sampath 2004; Faria, 2006).

O macho corteja a fêmea durante todo o período de acasalamento, ele nada em torno da fêmea exibindo suas nadadeiras e em alguns momentos eles nadam lado a lado quando ocorre o chamado abraço nupcial. O processo de desova pode demorar horas (Smith, 2005). Quando os filhotes estiverem nadando normalmente, na posição horizontal, em torno de três a cinco dias após a eclosão é hora de retirar o macho, pois este irá comer os juvenis e começar a oxigenar a água já que os filhotes ainda não possuem o labirinto formado e não conseguem ainda aproveitar o oxigênio aéreo (Kim, 2006).

O *B. splendens* é uma espécie carnívora com trato digestivo curto, sua alimentação deve ser dividida entre várias e pequenas porções diariamente, uma vez que possui rápida digestão. Dentre os itens a serem oferecidos, inclui-se o alimento vivo como, artêmia, dáfnia, minhocas de jardim cortadas em pequenos pedaços, larvas de *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), larva de mosquito, entre outros (Viana, 2008).

As características morfológicas desejáveis, como belas nadadeiras e corpo colorido com reflexos metálicos e iridescentes são o resultado de uma longa seleção feita por criadores (Pamplona et al., 2004; Kim, 2007). Atualmente, além do aquarismo convencional, essa espécie tem sido utilizada no Brasil como controle biológico de mosquitos em caixas d'água e em outros recipientes, como os das espécies *Aedes aegypti*, no Ceará, e o da *Culex quinquefasciatus* em Pernambuco (Pamplona et al., 2004).

2.2 Compostos nitrogenados e a qualidade da água

Dentro de um sistema de produção animal, seus variados parâmetros devem se encontrar em equilíbrio, a fim de promover condições que proporcionem o melhor desempenho zootécnico dos animais. A homeostase dos seres vivos, pode ser afetada por uma condição de estresse fazendo com que os animais tenham que se adaptar a uma nova condição que pode ser reversível ou irreversível (Selye, 1950; Esch et al. 1973).

O sucesso da atividade aquícola é limitado por diversos fatores. A qualidade do alimento ofertado e a qualidade da água do meio de cultivo são considerados os fatores mais relevantes dentro do sistema de produção. O entendimento dos limites de tolerância de uma espécie e sua manutenção em relação à qualidade da água são princípios indispensáveis em qualquer sistema de criação (Kinne 1976). Segundo Ostrensky e Wasielesky (1992) tais fatores influenciam decisivamente no sucesso ou fracasso dessa atividade produtiva.

A exposição frequente dos peixes em ambientes contaminados pode gerar múltiplas alterações no organismo dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (Jesus e Carvalho, 2008).

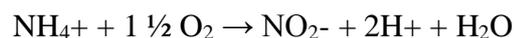
O conhecimento dos limites e concentrações dos compostos nitrogenados dentro de um sistema de criação de organismos aquáticos é fundamental para promover a máxima potencialidade do animal. Vale ressaltar que o nitrogênio é essencial para os animais, pois sua função fisiológica é a formação de proteínas, ácidos nucléicos e coenzimas (Tiago, 2000).

Sánchez et al. (2012) ressaltaram dois aspectos sobre os quais a qualidade de água é primordial à prática do cultivo de organismos aquáticos, o primeiro diz respeito a oferecer condições ambientais voltadas à maximização das respostas zootécnicas buscadas nestes organismos, tais como, sobrevivência, reprodução e crescimento. O outro se refere à tentativa de minimizar os efeitos causados aos corpos receptores do efluente produzido, motivo este que pode ser um entrave à instalação de um empreendimento aquícola.

As intensificações das práticas aquícolas com o aumento das densidades de estocagem produzem proporcionalmente aumento dos resíduos nitrogenados. A amônia é o principal composto excretado pela maioria dos organismos aquáticos e pode atingir níveis tóxicos dentro do sistema e reduzir dessa forma a produtividade e o crescimento dos animais cultivados (Miron et al., 2011).

De acordo com Esteves (1998), a formação de compostos nitrogenados também ocorre como resultado da decomposição aeróbia e anaeróbia da matéria orgânica.

No ambiente aquático a amônia é oxidada por bactérias nitrificantes do gênero *Nitrossomonas*, conforme a reação:



O nitrito, produto desta reação, também é oxidado principalmente por bactérias nitrificantes do gênero *Nitrobacter* a nitrato (NO_3^-) (Arana, 1997; Oliveira et al., 2006), conforme a reação:



A nitrificação é um processo aeróbio, ocorre somente nas regiões onde há oxigênio disponível, já a desnitrificação, transformação do nitrato em nitrogênio molecular, ocorre principalmente em condições anaeróbias onde há baixas condições de oxigenação. Os processos de nitrificação e desnitrificação são interligados, ou seja, ao final de um período em condições anaeróbias, em geral ocorre grande quantidade de nitrogênio amoniacal. Com a oxigenação do meio aquático, inicia-se um intenso processo de nitrificação, que resulta no consumo de grande parte da amônia acumulada (Pereira e Mercante, 2005).

As concentrações de compostos inorgânicos nitrogenados no solo e em águas superficiais apresentam um crescente aumento em várias regiões do mundo, contribuindo para a degradação de ecossistemas aquáticos marinhos, estuarinos e dulcícolas. Conseqüentemente, os organismos aquáticos sofrem os efeitos tóxicos desse processo de eutrofização (Smith et al., 1999; Howarth et al., 2000).

De acordo com Pillay e Kutty (2005) os níveis de metabólitos dissolvidos (amônia e nitrito) no ambiente aquícola são preocupantes e ganham importância principalmente em sistemas intensificados de cultivo, em sistemas fechados e durante o transporte de animais vivos, pois a presença desses compostos demanda atenção mesmo em baixas concentrações.

Na produção de peixes ornamentais, o principal sistema utilizado no Brasil é o semi-intensivo, que pode ser caracterizado por baixa renovação de água, pequenos viveiros e utilização de alimento vivo. Entretanto, a utilização deste tipo de sistema pode causar rápidas flutuações na qualidade da água, expondo os peixes a fatores estressantes. Provavelmente, esse estresse é o principal fator causador de doenças e mortalidade nos peixes ornamentais (Zuanon, 2007).

Segundo Boyd (1992) os fertilizantes utilizados em viveiros e tanques de criação geralmente contêm nitrogênio nas formas de amônia e nitrato. A acumulação dessas formas inorgânicas constitui um dos principais obstáculos para o desenvolvimento intensivo de peixes.

No meio aquoso, a amônia está presente na forma ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3), as quais juntas constituem a amônia total ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) a forma não ionizada chega a ser de 300 a 400 vezes mais tóxica que a forma ionizada da amônia (Thurson et al., 1981). A concentração das diferentes formas da amônia vai depender diretamente de fatores como pH, temperatura, pressão parcial e da composição iônica da água (Baldisserotto, 2002; Randall e Tsui, 2002).

A forma química mais tóxica da amônia, é a amônia não ionizada, que por ser de natureza lipofílica atravessa as membranas celulares por difusão simples. A amônia difunde-se facilmente através das membranas respiratórias, causando danos ao epitélio branquial e, como consequência, dificulta as trocas gasosas entre o animal e a água, desestabilizando também o sistema de osmorregulação e ionorregulação (Kormanik e Cameron, 1981; Roumieh et al. 2012).

A amônia é o principal composto de excreção nitrogenada decorrente do catabolismo proteico que ocorre em peixes (Hegazi, 2010), em um processo conhecido por desaminação no qual a clivagem do grupo amino resulta em uma fonte de energia e amônia (Dolomatov et al., 2011). Nos peixes ósseos, como já relatado, a excreção de amônia ocorre principalmente através das brânquias por difusão de acordo com o gradiente de concentração (Evans et al., 2005).

Dentro de um sistema de produção aquícola, o nitrito encontra-se sob duas formas: o ácido nítrico (HNO_2) e o nitrito (NO_2^-), e o equilíbrio entre as duas formas é determinado primeiramente pelo pH do meio (Lima, 2005). Um desequilíbrio nos processos de nitrificação e desnitrificação bacteriana pode gerar acúmulo de NO_2^- no sistema aquático (Grosell e Jensen, 2000).

A acumulação de nitrito em um tanque de piscicultura pode reduzir o crescimento, aumentar o consumo de oxigênio e excreção de amônia, além de causar outras alterações fisiológicas (Hanson e Grizzle, 1985; Alcaraz e Espina, 1997; Costa, 2002). O nitrito em altas concentrações provoca a oxidação do átomo de ferro da molécula da hemoglobina do sangue, convertendo-a em metahemoglobina, molécula incapaz de transportar oxigênio, estabelecendo-se um quadro de cianose e hipóxia, mesmo havendo oxigênio em abundância na água (Duborow et al., 1997). Assim, diminui a quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo (Tahon et al., 1988).

A formação da metahemoglobina pode ocasionar a morte do peixe como resultado da hipóxia por diminuir a quantidade de hemoglobina funcional (oxi-hemoglobina) nos eritrócitos e diminuir o hematócrito (Adragna e Lauf, 1998). De acordo com Jensen et al.

(1987), a intoxicação por nitrito pode ser responsável pela eliminação de eritrócitos não funcionais em decorrência da precipitação da hemoglobina no interior dos mesmos. Esta precipitação ocorre pela diminuição da solubilidade da hemoglobina quando ocorre a diminuição de volume celular dos eritrócitos.

O nitrito segue a mesma rota fisiológica de entrada do íon cloreto em peixes (Williams e Eddy, 1986). Assim, a concentração de nitrito que pode se acumular no plasma dos peixes varia entre 10 a 100 vezes a concentração presente no meio (Holt e Arnold, 1996).

Segundo Baldisserotto (2002) uma das formas de eliminar os efeitos causados pela ação do nitrito é a renovação do meio. Já no caso de sistemas fechados é importante que os filtros biológicos, constituídos por bactérias nitrificantes sejam eficientes e bem dimensionados para que não ocorra a acumulação de nitrito dentro do sistema. As bactérias nitrificantes apresentam crescimento muito lento e são microrganismos sensíveis e extremamente suscetíveis a uma variedade de inibidores como, pH, temperatura, relação Carbono:Nitrogênio, alcalinidade e oxigênio dissolvido. Todos fatores descritos podem inibir a ação de nitrificação destes microrganismos e por conseguinte a efetividade dos filtros biológicos (Metcalf e Eddy, 1991).

De acordo com Hanson e Grizzle (1985) algumas espécies de peixes expostas a concentrações de nitrito não morrem, mas apresentam sintomas de estresse e aumento da susceptibilidade às enfermidades bacterianas, o que pode levar a redução no crescimento e ganho de peso. Costa (2002) observou o efeito tóxico do nitrito em tambaqui (*Colossoma macropomum*) em 24 horas de exposição, houve aumento dos níveis de metahemoglobina, anemia hemolítica, alteração na coloração da pele e pronunciados inchaços abdominais. Já o Matrinxã (*Brycon cephalus*) expostos a 0,2; 0,4 e 0,6 mg.L de nitrito diminuíram o hematócrito, hemoglobina total e o número de células vermelhas do sangue (Avilez et al., 2004)

2.3 Testes de Toxicidade e estudo histológico

Toxicidade é a característica de uma substância em provocar uma resposta do organismo a uma dose superior a uma concentração limiar por um período de exposição suficientemente longo. A resposta incorpora a soma de todos os estresses a que o organismo é submetido, bem como sua capacidade de compensação. Essas respostas podem ser avaliadas por meio de experimentos de laboratório genericamente denominados “testes de toxicidade” (Damato, 2011). Também pode ser definida como uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Ela depende

da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e também do tempo de exposição (Rand, 1995).

Testes de toxicidade são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles (Arenzon, 2013). Estes testes permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como comportamento, reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (Ronco, 2004; Costa, 2008).

Os testes de toxicidade são desejáveis em piscicultura, pois somente as análises químicas e físicas da água não são suficientes para estimar os seus efeitos nos organismos aquáticos (Key, 2007). Enquanto as análises físico-químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Assim, as análises físico-químicas e os testes de toxicidade se complementam (Costa, 2008). Diferentes espécies de organismos aquáticos não têm a mesma sensibilidade às mesmas substâncias tóxicas, e podem apresentar variações na sensibilidade nos distintos estágios de desenvolvimento (Ribeiro et al., 2009).

Testes de toxicidade visam estabelecer limites permissíveis de vários poluentes sobre os organismos aquáticos. É possível fornecer uma margem de segurança desses poluentes sobre a vida dos animais aquáticos (Bertoletti, 1990). Através dos testes de toxicidade, determinam-se o tempo e as concentrações em que o agente tóxico é potencialmente prejudicial (Fonseca, 1991).

Atualmente, a padronização de métodos para testes de toxicidade é um esforço da comunidade científica. As normas para realização de testes de toxicidade com organismos de água doce têm sido amplamente desenvolvidas e implementadas internacionalmente. No Brasil, ensaios toxicológicos para avaliar a toxicidade aguda em peixes, são padronizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas- ABNT e, estão restritos às espécies *Pimephales promelas* (peixe zebra) e *Danio rerio* (paulistinha). No entanto, servem de subsídio para a realização de testes de toxicidade com outras espécies de peixes.

Segundo Terra e Feiden (2003) a expressão de muitos agressores ambientais somente torna-se visível quando estão presentes em altas doses. Entretanto, quando eles existem em concentrações menores seus efeitos na bagagem genética dos indivíduos, podem interferir nas

funções fisiológicas, podendo alterar a frequência reprodutiva e/ou a qualidade e quantidade de organismos gerados. A curta exposição a contaminantes ambientais no meio aquático pode resultar em alterações que, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (Rand e Tsui, 1985; Jobling, 1995).

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. (2006), 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.

É considerado como biomarcador, qualquer alteração biológica no animal quando este é colocado na presença de um estressor como algum composto químico, poluente ou algum tóxico que podem se manifestar de diversas formas incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais que alterem o estado normal do animal causando prejuízo no crescimento (Van Gestel e Van Brummelen, 1996; Winkaler et al., 2001).

Estudos histológicos em peixes têm funcionado como um instrumento eficaz para identificar efeitos tóxicos de contaminantes na água (Schwaiger et al., 1997). Órgãos como as brânquias dos peixes têm sido alvo para muitos poluentes devido ao seu contato direto com o meio, sua área em relação ao volume e a sua multifuncionalidade como trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio iônico, excreção de compostos nitrogenados entre outros (Kikuchi et al., 1978; Wester et al., 2002). Assim, alterações branquiais são reconhecidas como um importante biomarcador para determinar os danos causados aos peixes pela exposição a diferentes contaminantes (Evans, 1987; Mishra et al. 1985; Arellano et al., 1999; Machado, 1999).

Ortiz Delgado et al. (2002) relataram indício entre a poluição aquática e as alterações histopatológicas em peixes. Estas alterações resultaram em uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que levaram à formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (Hinton & Laurén, 1990; Hinton et al., 1992).

A utilização de biomarcadores permite um exame específico dos órgãos e das células alvo, e como eles são afetados sob condições *in vivo*. Além disso, em avaliação de campo, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (Hinton et al., 1992).

Os estudos histopatológicos conseguem distinguir se as lesões nos órgãos são decorrentes de alguma doença ou pela exposição a contaminantes (Schwaiger et al., 1997).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2011.
- _____. ABNT. NBR 15499: ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração: método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2016.
- ADRAGNA, N.C. e LAUF, P.K. Role of nitrite, a nitric derivate, in K-CI cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells. *J. Membrane Bio.*, v.166, p.157-167, 1998.
- AGUIRE, A. Fact sheet for Betta splendens. In: Non native aquatic species in the Gulf of México and south Atlantic regions. Disponível em: http://nis.gsmfc.org/nis_factsheet.php. Acesso em: 20 set 2008.
- APHA. American Public Health Association Standard Methods for the examination of water and wastewater. 18 ed. Washington, 1992.
- ARANA, L.V. Princípios químicos de qualidade de água em aquíicultura: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis:UFSC. P.166, 1997.
- ARELLANO, J.M.; ORTIZ, J.B.; CANALES, M.L.G.; SARASQUETE,C. Histological alterations and induction of cytochrome P450 1A in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Histochem. J.*, v.33, p.11-12, 2001.
- ARENZON, A.C.; LORENZO, C.; COIMBRA, N.J., SCHULZ,U. H.A. determinação da toxicidade crônica para peixes baseada apenas na sobrevivência. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*,v. 8, n. 2, p.65-68, 2013.
- AVILEZ, I. M.; SILVA, L. H. A; MORAES, G. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comp Biochem Physiol part C*, v.39, p.35-139, 2004.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura. Ed. UFSM, Santa Maria, Brasil.2002.
- BERTOLETTI, E.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P.A. Variabilidade de Testes de Toxicidade com Peixes. *Revista Ambiente*, v.3 (1), p.52-58, 1990.
- BOYD, C.E. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama: Agricultural experimental station. Arlbun University, 1990. 482p.
- CARDOSO, R.S.; QUINTÃO, A.M.; TEIXEIRA, E.A et al. Caracterização socioeconômica da aquíicultura ornamental na zona da mata mineira. *Bol. Inst. Pesca*, v.38(1), p.89-96, 2012.
- CHAPMAN, F.A.; FITZ-COY, S.A.; THUNBERG, E.M. United States of America trade in ornamental fish. *J. World. Aquac. Soc.*, v.28, n.1, p.1-10, 1997.
- CONAMA - conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 357 de 17/03/2005. *Diário Oficial da União*. 53, p. 58-63, 18/03/2005. Dispõe sobre a classificação das águas. Disponível em : <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/2086.html>> acessado em 11/08/2015.
- COSTA, O.T.F.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*. v.232, p.627-636, 2002.
- COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. *Quím. Nova*, v.31(7), 2008.
- CRAMPTON, W.G.R. The impact of the ornamental fish trade on the Discus *Symphysodon aequifasciatus*: a case study from floodplain forests of Estação Ecológica Mamirauá. In: PADOCH, C.; AYRES, J. M.; PINEDO-VASQUEZ, M.;

- HENDERSON, A. (Eds.). Várzea: diversity, development, and conservation of Amazonia's whitewater floodplains. Bronx: The New York Botanical Garden Press, 1999a. p. 29-44.
- DAMAZIO, A. Criando o Betta. 2 ed. Rio de Janeiro: Inter-Revistas, 1992. 80p.
- DAMATO, M.; BARBIERI, E. Determinação da toxicidade aguda de cloreto de amônia para uma espécie de peixe (*Hyphessobrycon callistus*) indicadora regional. *O mundo da saúde*, v.35(4), p.401-407, 2011.
- DOLOMATOV, S.I.; SHEKK, P.V.; ZUKOW, W.; Kryukova, M.I. Features of nitrogen metabolism in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, v.21, p.733-737, 2011.
- DUBOROW, R.M.; CROSBY, D.M.; BRUNSON, M.W. Ammonia in fish ponds. *Southern Regional Aquaculture Center*, S.I., n.463,1997.
- ESCH, G.W.; GIBBONS, J.W.; BOURQUE, J.E. An analysis of the relationship between stress and parasitism. *Am. Midl. Nat.*, v.93(2), p.339-353, 1973.
- ESTEVES, F.A. 1998 Fundamentos da limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 602p.
- EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, v.85, p.97-177, 2005.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma, 2006, 176p.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estudo setorial para consolidação de uma aqüicultura sustentável no brasil. – Curitiba, 2007. Disponível em < ftp://ftp.fao.org/fi/document/aquaculture/sect_study_brazil.pdf. > Acessada em: 05-10-16.
- FARIA, P.M.C.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P. et al. Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens* (Regan 1910). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.30, p.134–49, 2006.
- FERREIRA, A.V. Ontogenia inicial e consumo de vitelo em malanotênia maçã (*Glossolepis incisus*, Weber, 1907). Dissertação Produção Animal, UENF. Campos dos Goytacazes, RJ. 2007.
- FONSECA, A.L.A Biologia da Espécie *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia* silvestre (Cladocera, Crustacea) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o Comportamento destes em Testes de Toxicidade Aquática com Efluentes Industriais. USP, 1991, 210p.
- GERSTNER, C.L.; ORTEGA, H.; SANCHEZ, H.; Graham, D.L. Effects of the freshwater aquarium trade on wild fish populations in differentially-fished areas of the Peruvian Amazon. *J. Fish. Biol.*, v.68, p.862-875, 2006.
- GORDON, M.; AXELROD, H.R. Siamese Fighting Fish. Jersey City, NJ: T.F.H. Publications. 1968. 64p.
- GOUVEIA JR,A.; ROMÃO, C.F.; BRITO, T.M.; VENTURA, D.F. Effects of Trophic Poisoning with Methylmercury on the Appetitive Elements of the Agonistic Sequence in Fighting-Fish (*Betta Splendens*). *Span. J. Psychol.*, v.10, p.436-448. 2007.
- GROSELL, M., JENSEN, F.B. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.*, v.50, p.97-107, 2000.
- GUEDES, R.N.C. *Toxicologia de Inseticidas - III (mecanismos de ação de inseticidas)*. Apostila de entomologia - Universidade Federal de Viçosa departamento de biologia animal setor de entomologia. 1991. Pg. 35-310
- HANSON, L. e GRIZZLE. Nitrite-induced predisposition of channel catfish to bacterial diseases. *Fish Culture*, v.47, p. 98-101, 1985.

- HEGAZI, M.M.; ATTAI, Z.I.; HEGAZI, M.A.M.; HASANEIN, S.S. Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain. *Aquaculture*, v.299, p.149-156, 2010.
- HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *Am. Fish. Soc. Symp.*, v.8, p.51- 66, 1990.
- HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; et al. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE Jr, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p.155 –196.
- HOLT, J.; ARNOLD, C. Effects of ammonia and nitrite on growth and survival of red drum eggs and larvae. *T. Am. Fish. Soc.*, v.112, p.558-562, 1996.
- HOWARTH, R.W,D; ANDERSON, J; CLOERN, C; et al.. Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. *Iss. Ecol.*, v. 7, p. 1-15, 2000.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquariofilia., Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas. Coordenador: Clemeson Pinheiro. Brasília, versão revisada, agosto, 2008, 217p.
- JAMES, R.; SAMPATH K. Effect of different feeds on growth and fecundity in ornamental fish, *Betta splendens*. *Indian. J. Fish.*, v.49, p.279-285, 2002.
- JAROENSUTASINEE, M. e JAROENSUTASINEE, K. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *J. Fish. Biol.*, v.58, p.1311-1319, 2001a.
- JENSEN, F.B.; ANDERSEN, N.A.; HEISLER, N. Effect of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol.*, v.157, p.533-541, 1987.
- JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecol Bras.*, v.12(4), p.680-693, 2008.
- JOBLING, M. Environmental biology of fishes. London: Chapman & Hall, 1995. p.455.
- KEY, P.; CHUNG, K.; SIEWICKI, T.; FULTON, M. Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.68, p.272-277, 2007.
- KIKUCHI, T.; ARAKI, H.T.; MAEDA, K.; MAEKAWA, Transmission of polar electric fields to the equator, *Nature*, v.273, p.650–651, 1978.
- KIM, C.Y.; BACCARIN, A.E.; CAMARGO, A.F.M.; PREHL, R.C. Sobrevivência de larvas de *Betta splendens* alimentadas com diferentes tipos de alimento. In: AQUACIÊNCIA 2006, RS.
- KINNE, O. 1976. Mar. Ecol. Ed. John Wiley & Sons, NY, USA, Vol III, part 1, 577.
- KORMANIK GE.; CAMERON, J. Ammonia excretion in animals that breathe water, a review. *Mar Biol Lett.*, v.2, p.11-2, 1981.
- KRULL, M.; ALVES DE LIMA, C.C.; DE OLIVEIRA, M.L.T.; et al. F. State of the art of Brazilian ecotoxicology. *Integr Environ. Assess. Manag.*, v.7, p.690-691. 2011.
- LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO,R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 2004. p.263-272.
- LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw- Hill book Company, 1968. 258p.

- LUZ, R.K.; ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura do Mandi-amarelo *Pimelodus maculatus* Lacépède, em Diferentes Densidades de Estocagem nos Primeiros Dias de Vida. *Braz. J. Anim. Sci.*, v.31(2), p.560-565, 2002.
- MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. UNOPAR Científica. *Ciênc. Biol. Saúde*, v.1(1), p 63-76, 1
- METCALF, E. Inc. Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse. McGraw Hill, 4th edition, 2003.
- MIRANDA-FILHO, K.C.; PINHO, G.L.L.; WASIELESKY, W.J.; BRITO, W.F et al. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.150C, p.377-382, 2009.
- MIRON, D.S.; BECKER A.G.; LORO, V.L.; BALDISSEROTTO, B. Waterborne ammonia and silver catfish, *Rhamdia quelen*: survival and growth. *Ciênc. Rural*, v.41, p.349-353, 2011.
- MISHRA, V.; LAL, H.; CHAWLA, G.; VISWANATAN, P. N. Pathomorphological changes in the gills of fish fingerlings (*Cirrhina mimgala*) by lineal alkylbenzene sulfonate. *Ecotox. Environ. Safe.*, v.10, p.302-308, 1985.
- MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.; AMADO, L.L et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.146C, p.221-234, 2007.
- MONVISES, A.; NUANGSAENG, B.; SRIWATTANAROTHAI, N.; PANIJPAN, B. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *Science Asia*, v.35, p.8-16. 2009.
- MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. Páginas 343-383 in CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. editores. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática (Aquabio), Jaboticabal, SP.
- MORAES, G.; POLEZ, V.L.; IWAMA, G.K. Biochemical responses of two Erythrinidae fish to environmental ammonia. *Braz. J. Biol.*, v.64(1), p.95-102, 2004.
- MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/Cartilha-Balan%C3%A7o-2013-Minist%C3%A9rio-Pesca-Aquicultura.pdf>. Acesso em 13/08/2015.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: 2008 – 2009. Brasília, 2010.
- NELSON, J.S. Fishes of the world. 4 ed. Canada: John Wiley e Sons, Inc., 2006, P. 601.
- OLIVEIRA, P.P.A.; TRIVALIN, P.C.O.; OLIVEIRA, W.S.; CORSI, M. Fertilização com nitrogênio e enxofre na recuperação de pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em Neossolo quartzarênico. *R. Bras. Zootec.*, v.34:1121-1129, 2005.
- ORTIZ-DELGADO, J.B.; SARASQUETE, C.; BEHRENS, A.; GONZALEZ DE CANALES, M.L. et al. Expression, cellular distribution and induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquatic. Toxicol.*, v.60, p.269-283, 2002.
- OSTRENSKY, A.; BRUGGER, A.M. Studies on the viability of silverside *Odontesthes argentinensis* cultivations: acute toxicity of ammonia. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.44, p.413-414, 1992.
- PAMPLONA, G.C.; LIMA, J.W.O.; CUNHA, J.C.L. Evaluation of the impact on *Aedes aegypti* infestation in cement tanks of the municipal district of Canindé, Ceará, Brazil

- after using the *Betta splendens* fish as an alternative biological control. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.37, p.400-404. 2004.
- PEREIRA, L. e MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. *Bol. Inst. Pesca*, v.31(1), p.81, 2005.
- PEZZATO, L.E.; SCORVO FILHO, J.D. Situação atual da aquicultura na região sudeste. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. eds. *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq/MCT, 2000.1
- PHILLIPS, T. A.; SUMMERFELT, R. C.; CLAYTON, R. D. Feeding frequency effects on water quality and growth of walleye fingerlings in intensive culture. *Prog. Fish. Cult.*, v. 60, n.1, p.1-8, 1998.
- PIETRINA, D.; MODENA, M.; GUIDETTI, P et al. Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW – Mediterranean). *Mar. Pollut. Bull.*, v.44, p.2002.
- PILLAY, T.V.R.; KUTTY, M.N. *Aquaculture Principles and Practices* 2 ed. Wiley-Blackwell, 2005. 640p.
- RAMNARINE, I. W.; PIRIE, J. M.; JOHNSTONE, A. D. F.; SMITH, G. W. The influence of ration size and feeding frequency on ammonia excretion by juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish. Biol.*, v.31(4), p.545- 559, 1987.
- RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. 2nd ed. Rand, G. M., ed. Washington, 1995.
- RANDALL, D.J. e TSUI, T. K.N. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.*, v.45, p.17-23, 2002.
- RIBEIRO, F.A.S.; CARVALHO JUNIOR, J.R.; FERNANDES, J.B.N.; NAKAYAMA, L. Comércio brasileiro de peixes ornamentais. *Panorama da Aquicultura*, v.18(110), p.54-59, 2008.
- RIBEIRO, F.A.S.; CARVALHO JUNIOR, J.R.; FERNANDES, J.B.K.; NAKAYAMA, L. Cadeia Produtiva do Peixe Ornamental. *Panorama da Aquicultura*, v. 19(112), p.36-45, 2009.
- RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Ottawa; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.189 p. 2004.
- ROUMIEH, R.; BARAKAT, A.; ABDELMEGUID, N.E et al. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskal 1775). *Aquac. Res.*, v.44, p.1777-1790, 2012.
- SÁNCHEZ O.I.A.; MATSUMOTO, T. Hydrodynamic characterization and performance evaluation of an aerobic tree phase airlift fluidized bed reactor in a recirculation aquaculture system for Nile tilapia production. *Aquacult. Eng.*, v.47, p.16-26, 2012.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. aquat. Ecosyst. Stress. Recovery*, v.6(1), p.75- 86, 1997.
- SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *J. aquat. Ecosyst. Stress. Recovery*, v.8, p.231–240, 2001.
- SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. J. Med.*, v.1, p.1383-1392, 1950.
- SMITH, V,H; TILMAN, G,D; NEKOLA, J,C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ Pollut.*, v. 100, p.179-196, 1999.

- SMITH, T. S. Primary Sex Reversal in Female *Betta splendens* Following treatments with Temperature and Trenbolone Acetate. Faculty of the Department of Biology East Tennessee State University. 2005. 64p.
- TAHON, J.P.; VAN HOOFF, D.; VINCKIER, C et al. The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *Biochem. J.*, v. 249, p.891- 896, 1988.
- TERRA, N.R.; FEIDEN, I. R. Reproduction and survival of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Cladocera) under different hardness conditions. *Acta Limnologica Brasiliensis*, v.15, n.2, p.51-55, 2003.
- TIAGO, G.G. Aquicultura, meio ambiente e legislação. Florianópolis: Annablume, 2000, p. 162.
- TWITCHEN, I.D.; EDDY F.B. Sublethal effects of ammonia on freshwater fish. in R. Müller and R. Lloyd (Editores), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Blackwell Scientific Publications, Fishing News Books, Londres, 1994, p. 135-147.
- VALENTIN, F.N.; NASCIMENTO, N.F.; SILVA, R.C et al. Early development of *Betta splendens* under stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Zygote*, v. 23(2), p. 247-256, 2015.
- VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, v.5, p.217-225, 1996.
- VIANNA, W. Uma discussão sobre a alimentação do *Betta splendens*. disponível em: <http://www.aquario.com/aqr/index>. Acesso em: 08 set 2016.
- VINATEA, L.A. Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura. Florianópolis, SC: EDUFSC, 1999. 310 p
- WESTER, P.W.; VAN DER VEM, L.T.M.; VETHAAK, A. D et al. Aquatic Toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.11, p.289-295, 2002.
- WILLIAMS, M.; EDDY, F.B. Some effects of adrenaline on ion transport and nitrite-induced methaemoglobin formation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Exp. Zool.*, v.241, p.269-273, 1987.
- WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta. Sci.*, v.23(2), p. 507-514, 2001.
- XAVIER, M.B.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; TAKINO, M. *Euglena sanguinea* Ehrenberg bloom in a fish-breeding tank (Pindamonhangaba, São Paulo, Brazil). *Algol Stud.*, v.62, p.133-142, 1991.
- ZUANON, J.A.S. Produção de peixes ornamentais nativos. *R. Bras. Zootec.*, v.40, p.165-174, 2011.
- ZUANON, J.A.S. ; SALARO, A.L.; FURUYA, W.F. Produção e nutrição de peixes ornamentais. *R. Bras. Zootec.*, v.40, p.165-174, 2011.
- WOLFSHEIMER, G. The guide to owning Bettas. Neptune City: T.H.F. Publications, 2003. 63p.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estimar a Concentração Letal Mediana (CL₅₀) dos compostos nitrogenados, amônia (na forma total e não ionizada) e nitrito e analisar efeitos histopatológicos gerados no peixe ornamental *B. splendens* em três diferentes idades.

4.2 Objetivos específicos

- Estimar os respectivos níveis de segurança para os compostos nitrogenados amônia (total e não ionizada) e nitrito em três diferentes idades estudadas.
- Descrever as principais alterações histopatológicas por meio de microscopia ótica e eletrônica de varredura, causadas pela exposição às diferentes concentrações de amônia (na forma total e não ionizada) e nitrito nas três diferentes idades do *B. splendens*.

ARTIGO

Efeito letal da amônia e do nitrito nas fases iniciais de vida do *Betta splendens*

Lethal effect of ammonia and nitrite in the early life stages of *Betta splendens*

Renata Rodrigues Sampaio^{a-1}, Daniela Chemim de Melo Hoyos^a, Raphael Nogueira Bahiense^a, Stella Rubim de Sousa^a, Franklin Fernando Batista da Costa^a, Luciano dos Santos Rodrigues^b, Kleber Campos Miranda Filho^a.

^a Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^b Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

A toxicidade dos compostos nitrogenados para os peixes varia consideravelmente e depende de um grande número de fatores externos e internos. Dentre os fatores externos o mais importante é a qualidade da água e dos fatores internos a suscetibilidade individual dos peixes. A toxicidade aguda da amônia (total e não ionizada) e do nitrito foram estudadas em condições semi-estáticas durante um período de 96 h no peixe ornamental *Betta splendens*. Animais de 7, 21 e 45 dias de vida foram expostos a concentrações crescentes de amônia total 0, 35, 42, 50, 65 e 80 mg-L; 0, 50, 65, 80, 87 e 95 mg-L; 0, 125, 135, 145, 155 e 165 mg-L respectivamente e crescentes concentrações de nitrito, 0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg-L; 0, 50, 75, 100, 125 e 175 mg-L; 0,120, 160, 200, 240 e 280 mg-L respectivamente. Os resultados da CL₅₀ para animais de 7, 21 e 45 dias, expostos a amônia e nitrito foram 36,87 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺), 61,19 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺) e 132,94 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺) e 51,5 mg-L (N-NO₂⁻); 82,5 mg-L (N-NO₂⁻) e 141,96 mg-L (N-NO₂⁻) respectivamente. De acordo com os resultados obtidos foi possível estimar o nível de segurança de amônia e nitrito para *B. splendens* de 7, 21 e 45 dias de vida em 3,69 mg-L, 6,12 e 13,29 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺) e 5,15 mg-L, 8,25 e 14,20 mg-L N-NO₂ respectivamente. Foram observadas alterações histológicas nas brânquias como hiperplasia, fusão lamelar e desprendimento do epitélio resultado da exposição aos contaminantes. De acordo com os resultados obtidos o *B. splendens* se mostrou tolerante à altas concentrações de amônia e nitrito no meio aquático.

Palavras chave: Compostos nitrogenados, peixe ornamental, qualidade da água, toxicidade.

Abstract

The toxicity of nitrogen compounds to fish varies considerably and depends on many external and internal factors. Among the external factors, the most important is the water quality and the internal factors, the individual fish susceptibility. The acute toxicity of ammonia (total and non-ionized ammonia) and nitrite in the ornamental fish *Betta splendens*, were studied in semi-static conditions over a period of 96 h. Animals of 7, 21 and 45 days of life were exposed to increasing concentrations of total ammonia 0, 35, 42, 50, 65 and 80 mg-L; 0, 50, 65, 80, 87 and 95 mg-L; 0, 125, 135, 145, 155 and 165 mg-L respectively and increasing concentrations of nitrite, 0, 25, 50, 75, 100 and 125 mg-L; 0, 50, 75, 100, 125 and 175 mg-L; 0.120, 160, 200, 240 and 280 mg-L respectively. The results of LC₅₀ (96h) for ammonia and nitrite on animals of 7, 21 and 45 days were 36.87mg/L (N-NH₃ + NH₄⁺), 61.19 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺) and 132.94 mg/L (N-NH₃ + NH₄⁺) and 51.5; 82.5 and 141.96 mg/L N-NO₂⁻, respectively. According to the results, it was possible to estimate the safe level of ammonia and nitrite for *B. splendens* of 7, 21 and 45 days of life at: 3.69; 6.12 and 13.29 mg/L (N-NH₃

+ NH_4^+) and 5.15; 8.25 and 14.20 mg/L N- NO_2^- , respectively. Histological changes were observed in the gills as hyperplasia, lamellar fusion and detachment of the epithelium resulting from exposure contaminants. According to the results, *B. splendens* was tolerant to high concentrations of ammonia and nitrite in the aquatic environment.

Key words: Ornamental fish, Nitrogenous compounds, toxicity, water quality.

1. Introdução

A aquicultura ornamental é uma atividade que tem destaque atualmente. É considerada uma das atividades mais lucrativas da área, além de receber constante destaque internacional pela descoberta e identificação de espécies ornamentais (Rossoni et al. 2014).

O peixe ornamental *Betta splendens* é mundialmente conhecido devido a sua beleza exuberante e é considerado uma das espécies ornamentais de maior produção no mundo. É uma espécie de valor econômico notável e muito apreciada pelos produtores por seu sucesso reprodutivo (Verbeek et al., 2011). Ribeiro (2008) relata que uma unidade de produção de betas pode gerar até R\$ 30 mil por hectare.

No Brasil, a criação de peixes ornamentais tem como característica a baixa renovação de água, sendo considerada uma das principais causas de doenças e mortalidade neste tipo de criação, que quando não bem monitorado pode ocasionar variações bruscas na qualidade da água e favorecer uma condição de estresse para o animal (Zuanon, 2011).

As intensificações das práticas aquícolas com o aumento das densidades de estocagem produzem proporcionalmente aumento dos resíduos nitrogenados. A amônia é o principal composto nitrogenado excretado pelos peixes e pode acumular-se no meio e reduzir a produtividade e o crescimento dos animais cultivados (Miron et al., 2011).

Em sistema de produção como o sistema de recirculação, o biofiltro é uma ferramenta fundamental para garantir a qualidade da água, em relação aos compostos nitrogenados, e o sucesso na produção. As bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* colonizadas no biofiltro promovem a nitrificação, fazendo com que os compostos nitrogenados não se acumulem no sistema e causem prejuízos ao desempenho e a saúde dos peixes. (Kubitza, 2006; Pedreira et al., 2009; Valenti et al., 2009).

A sensibilidade a poluentes no meio aquático é espécie específica. Diferentes espécies de organismos aquáticos não têm a mesma sensibilidade a substâncias tóxicas, e podem apresentar alterações na tolerância nas diferentes fases de desenvolvimento (Ribeiro et al., 2009). Sendo assim, as análises físico-químicas e os testes de toxicidade se complementam (Costa, 2008).

Os peixes apresentam estratégias de desenvolvimento conforme o meio em que habitam (Nakatani et al., 2001). O peixe *Betta splendens* pode sobreviver em águas com baixos níveis de oxigênio dissolvido devido ao órgão chamado labirinto, que permite ao animal respirar o oxigênio atmosférico (Wolfsheimer, 2003; Boumendjel, 2006; Faria et al., 2006). Entretanto, a formação do labirinto ocorre normalmente entre o 14° ao 28° dia de vida (Damazio, 1992). Dessa forma, a qualidade da água deve ser monitorada diariamente para não comprometer o desenvolvimento do órgão labirinto e o crescimento do animal.

Os testes de toxicidade são desejáveis em atividades aquícolas, pois somente as análises químicas e físicas da água não são suficientes para estimar os seus efeitos nos organismos aquáticos (Key, 2007). Os testes de curta duração utilizam a mortalidade como observação final para determinação dos efeitos deletérios dos diferentes agentes tóxicos. Como produto final temos a estimativa da concentração que causa letalidade a 50% dos organismos testados em determinado tempo de observação (concentração letal mediana ou CL₅₀). Estes testes também são empregados para indicar uma faixa adequada de concentração tóxica para testes de médio e longo prazo (APHA, 1992).

A histopatologia associada aos testes de toxicidade podem ser considerados um excelente método de comprovação de danos causados por estressores existentes no meio ambiente (Marcon et al., 2015). As análises histológicas e as análises realizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura atuam como uma importante ferramenta para estimar o dano causado nas brânquias dos animais expostos as crescentes concentrações de amônia e nitrito.

O efeito tóxico agudo dos compostos nitrogenados, amônia e nitrito permanece desconhecido para o peixe ornamental *B. splendens*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estimar a concentração letal mediana (CL₅₀) dos compostos nitrogenados, amônia e nitrito na produção do peixe ornamental *B. splendens* em três diferentes idades (com o órgão labirinto sem formação, em formação e já formado), assim como estimar os respectivos níveis de segurança e descrever as principais alterações histopatológicas visando o estabelecimento de valores máximos permitidos dos diferentes compostos nitrogenados no ambiente de produção da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Instalações e Condições Experimentais

O trabalho foi desenvolvido no setor de maricultura do laboratório de aquicultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais utilizados no

experimento foram reproduzidos no laboratório de peixes ornamentais da mesma unidade e mantidos no laboratório de maricultura em caixas de polietileno de 100 litros (Fig.2), até atingirem a idade necessária para o estudo. As caixas foram abastecidas com água proveniente de poço artesiano, fotoperíodo de 12 horas, adaptadas com aeração por meio de difusores de ar.

Os animais foram alimentados com artêmia recém-eclodida até o sétimo dia de vida, após este período a alimentação foi intercalada entre artêmia e ração comercial (Alcon Mini Beta - 45% proteína) 3 vezes ao dia.



Figura 2. Caixas de manutenção dos animais. (Fonte: Próprio autor)

2.2 Teste de alimentação com *Betta splendens*

O objetivo do teste foi identificar se os animais permaneceriam vivos sem alimentação durante o teste agudo de 96 horas. Os testes foram realizados com 10 animais em béqueres de 1 litro (animais com 7 dias de vida) e béqueres de 2 litros (animais de 21 e 45 dias de vida).

A partir dos testes de alimentação, foi identificado que larvas de *B. splendens* com sete dias de vida sem alimentação por um período de 3 dias leva a 100% de mortalidade. Os animais de 21 dias de vida sem alimentação apresentaram 30% de mortalidade durante 96 horas e os animais sobreviventes se apresentaram menos ativos quando comparado aos que se alimentaram uma vez ao dia. Já os animais de 45 dias de vida sobreviveram durante o teste de 96 horas e se apresentaram mais ativos que os animais de 21 dias no mesmo teste e menos ativos em relação ao grupo que se alimentou uma vez ao dia.

Sendo assim, para que o efeito do jejum não interferisse no resultado dos testes de toxicidade aguda com os compostos nitrogenados, foi elaborado um protocolo alimentar (Tab. 1), onde os animais do experimento eram alimentados uma vez ao dia às 12:00 h, três horas antes da renovação do meio experimental (Fig. 3).

Tabela 1. Alimentação fornecida às formas jovens de *Betta splendens* diariamente durante os testes de toxicidade aguda com compostos nitrogenados. Adaptado de Lombardi e Gomes (2008); Schütz et al. (2008).

Idade dos animais	(mL)	Náuplios de artêmia (Unidades)
7 dias	3	156
21 dias	8	416
45 dias	15	780



Figura 3. Animal de sete dias alimentado uma vez ao dia. (Fonte: Próprio autor)

2.3. Testes de toxicidade aguda – CL₅₀

O experimento foi apresentado e aprovado pelo CEUA de acordo com o protocolo de nº 335/2016.

As concentrações de amônia e nitrito foram preparadas a partir de soluções estoque de amônia e nitrito, utilizando cloreto de amônio P.A. (Merck[®]) e o nitrito de sódio P.A. (Merck[®]), respectivamente. As concentrações definitivas de amônia e de nitrito (Tab.2) foram definidas por meio de testes toxicológicos agudos preliminares.

Antes de dar início aos experimentos, os animais de cada idade foram aclimatados por 5 dias às condições do teste, quais sejam: temperatura (28°C), oxigênio dissolvido (6,12), pH (7,01), alcalinidade (90 mg-L CaCO₃) e salinidade (0,09 ‰).

Tabela 2. Concentrações de amônia e nitrito utilizadas durante os experimentos de toxicidade aguda.

Idade	Amônia Total mg-L						Nitrito mg-L					
	0	35	42	50	65	80	0	25	50	75	100	125
7d.	(A1)	(A2)	(A3)	(A4)	(A5)	(A6)	(N19)	(N20)	(N21)	(N22)	(N23)	(N24)
21d.	(A7)	(A8)	(A9)	(A10)	(A11)	(A12)	(N25)	(N26)	(N27)	(N28)	(N29)	(N30)
45 d.	(A13)	(A14)	(A15)	(A16)	(A17)	(A18)	(N31)	(N32)	(N33)	(N34)	(N35)	(N36)

2.3.1 Teste de toxicidade aguda com amônia e nitrito- animais de 7, 21 e 45 dias de vida

Os testes de toxicidade aguda com peixes de 7 dias de idade, peso médio 0,036g foram realizados em béqueres de vidro com capacidade para 1 L. Para os animais de 21 e 45 dias de vida foram utilizados béqueres de vidro com capacidade para 2 L, animais com peso médio de 0,0208g e 0,687g respectivamente. Foram utilizados 10 peixes em cada unidade experimental, seguindo as normas da OECD (1992). Cinco concentrações crescentes de amônia e nitrito, mais o tratamento controle (sem adição do tóxico), todos em duplicata. Os testes de toxicidade foram realizados em três diferentes estufas de DBO (Fig. 4), uma para cada idade. Os valores médios das variáveis físico-químicas dos meios experimentais no início do experimento para os animais de 7, 21 e 45 dias de vida foram: temperatura $28 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$; $28 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$; $28 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$; pH $7,2 \pm 0,2$; $6,9 \pm 0,4$; $6,9 \pm 0,1$ oxigênio dissolvido $5,9 \pm 0,28$ mg/L; $6,2 \pm 0,23$ mg/L; $6,7 \pm 0,27$ mg/L e alcalinidade $77,5 \pm 10,60$ mg/L; $85,7 \pm 12,0$ mg/L; $79,5 \pm 9,45$ mg/L.



Figura 4: Estufas de DBO utilizadas durante o experimento. (Fonte: Próprio autor)

A mortalidade foi observada como parâmetro para avaliar a toxicidade dos nitrogenados. Nas primeiras 12 horas a mortalidade foi observada a cada 15 minutos, nas 12 horas seguintes a cada 30 minutos. Após as primeiras 24 horas a mortalidade foi monitorada a cada hora. A mortalidade foi avaliada quando os animais não respondiam mais a estímulos realizados com a ponta de uma pipeta de Pasteur e permaneciam inertes no fundo do béquer sem movimento observável. Além disso, alterações comportamentais como, natação lateral e em espiral, dificuldades em buscar o ar atmosférico e perda de apetite também foram registradas ao longo do experimento. As mortalidades e as alterações comportamentais foram registradas em planilha.

2.4. Análise da água

A cada 24 horas foram registrados de todas as unidades experimentais, os dados de pH, temperatura, salinidade, condutividade com pHmetro COMBO portátil (Hanna, modelo HI 98130) e oxigênio dissolvido (OD) com o oxímetro portátil (Hanna, modelo HI 9146). Para as análises de amônia e nitrito foi coletada uma alíquota de 10 mL para análise no espectrofotômetro mono-feixe (HACH, modelo DR/2010) com a finalidade de verificar se as concentrações nominais (concentração desejada no estudo) não diferiram das concentrações reais (concentração realmente testada) dos tóxicos em virtude da precisão da preparação. Para análise da alcalinidade dos meios experimentais foi empregado o método descrito em APHA (2008).

2.5. Cálculo da amônia não ionizada

Para calcular a amônia não ionizada a partir das concentrações de amônia total, utilizou-se a equação de Emerson et al. (1975) baseada na temperatura e valores de pH obtida em cada experimento.

$$\frac{\text{NH}_3 \text{ Livre}}{\text{Amônia total}} (\%) = \frac{100}{1 + 10 \left[0,09018 + \left(\frac{2729,92}{T + 273,20} \right) \right]^{-\text{pH}}}$$

Onde:

T = Temperatura do meio (C°)

pH = pH do meio

2.6. Estudo histológico

A análise histológica foi utilizada como ferramenta para detecção do efeito deletério causado às formas jovens de *B. splendens* expostos de forma aguda à amônia.

Para o referido estudo foram coletados seis animais de cada idade nas diferentes concentrações testadas ao longo das 96 h de exposição aguda à amônia e ao nitrito (Fig.5). Foram coletados preferencialmente os animais que se apresentavam moribundos e nas concentrações onde não houve mortalidade de pelo menos 6 animais, foram feitas amostragens aleatórias para a realização do estudo histológico.

Para o tratamento do material biológico foi utilizada a metodologia descrita por Luna (1968). De maneira resumida, os animais foram fixados inteiros em solução de Bouin (12 h) e transferidos para álcool 70%. Posteriormente, foi realizado o processamento histológico de rotina envolvendo os processos de desidratação, diafanização, inclusão dos animais inteiros em parafina, microtomia a 5 μ m, montagem e a coloração dos cortes em lâmina de vidro por meio da técnica hematoxilina-eosina, possibilitando a diferenciação dos componentes teciduais e celulares.

Para a microscopia eletrônica de varredura os animais foram fixados em fixador de Karnovsky (modificado) por 12 horas. Após o período de fixação, os animais foram inseridos em solução tampão fosfato a 4°C. Posteriormente as amostras foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio durante 2 h e lavadas em solução tampão de fosfato para dar início a desidratação em série graduada de etanol a 30, 50, 70, 80, 90% e mais três lavagens a 100% (10 min cada). Após a desidratação as amostras foram levadas ao secador de CO₂ líquido, e em seguida montadas no stubs (suporte que leva as amostras ao microscópio eletrônico de varredura) e levadas para processo de metalização. Com as amostras preparadas foram iniciadas as análises no microscópio eletrônico de varredura.



Figura 5. Animais coletados e preparados para histologia em microscopia ótica. (Fonte: próprio autor)

As alterações histopatológicas foram observadas qualitativamente de acordo com os estágios descritos por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994):

- Estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão.
- Estágio II, alterações severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão.
- Estágio III, alterações muito severas e irreversíveis

Tabela 3. Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto ao tipo das lesões e dos estágios em que se inserem. Adaptada de Poleksic & Mitrovic-Tutundžic (1994).

Alterações branquiais	Estágio
Hiperplasia do epitélio lamelar	I
Fusão incompleta de várias lamelas	I
Fusão completa de todas de várias lamelas	II
Fusão completa de todas as lamelas	I
Aneurisma lamelar	II
Hipertrofia do epitélio lamelar	I
Desprendimento epitelial	I
Dilatação do seio sanguíneo	I
Necrose	III

2.7 Análise Estatística

Valores médios das variáveis físico-químicas da água foram comparados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey utilizando o software Past. Versão 3.14. Os valores das CL50, em 24, 48, 72 e 96h, e seus respectivos intervalos de confiança (95%), foram estimados com a utilização do “programa” Trimmed Spearman Karber method (Hamilton *et al.* 1977). Os níveis de segurança foram estimados de acordo com Sprague (1971).

3. RESULTADOS

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação às variáveis físico-químicas da água (temperatura, oxigênio, alcalinidade, pH) quando comparados os tratamentos contendo amônia e nitrito em relação ao tratamento controle (Tab. 4).

Não foram observadas mortalidades em nenhum dos tratamentos controles. As concentrações reais de amônia e nitrito nas soluções testes não diferiram em mais de 5% das concentrações nominais utilizadas no estudo de toxicidade (Tab. 5, 6 e 7).

Tabela 4. Médias de temperatura, oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico (pH) e alcalinidade (mg. L-1 de Ca CO3) nos tratamento de toxicidade aguda da amônia e do nitrito em *Betta splendens* durante 96h de teste.

Tratamentos	T(°C)	OD (mg/L)	pH	Alcalinidade.
7 (A 1) ^{ns}	27,8 ± 0,01	5,88 ± 0,06	6,83 ± 0,45	70 ± 1011
7(A 2) ^{ns}	28,2 ± 0,05	6,12 ± 1,01	6,74 ± 1,01	76 ± 7,32
7 (A 3) ^{ns}	28,1 ± 0,03	5,98 ± 1,31	6,98 ± 0,04	77 ± 8,03
7 (A 4) ^{ns}	27,4 ± 0,01	6,02 ± 0,07	6,88 ± 0,31	85 ± 9,11
7 (A 5) ^{ns}	27,5 ± 0,02	6,11 ± 0,08	7,01 ± 0,05	90 ± 5,45
7 (A 5) ^{ns}	26,9 ± 0,05	5,89 ± 0,03	7,12 ± 0,08	75 ± 11,23
21 (A 7) ^{ns}	27,7 ± 0,01	6,02 ± 0,43	6,82 ± 0,33	97 ± 8,96
21 (A 8) ^{ns}	28,2 ± 0,01	6,06 ± 0,01	6,95 ± 0,01	85 ± 12,01
21 (A 9) ^{ns}	27,8 ± 0,03	6,04 ± 1,23	6,78 ± 1,34	90 ± 09,65
21 (A 10) ^{ns}	28,2 ± 0,02	5,91 ± 0,65	7,01 ± 0,54	95 ± 5,01
21 (A 11) ^{ns}	27,1 ± 0,01	5,96 ± 0,51	7,02 ± 0,67	93 ± 7,68
21 (A 12) ^{ns}	28,0 ± 0,01	6,12 ± 0,07	6,88 ± 1,00	88 ± 12,23
45 (A 13) ^{ns}	27,4 ± 0,03	6,11 ± 0,32	7,12 ± 0,07	85 ± 12,98
45 (A 14) ^{ns}	27,5 ± 0,05	6,06 ± 1,10	7,08 ± 0,09	80 ± 11,28
45 (A 15) ^{ns}	27,8 ± 0,06	5,95 ± 0,04	6,78 ± 0,04	95 ± 10,25
45 (A 16) ^{ns}	27,3 ± 0,01	5,89 ± 1,43	7,09 ± 0,64	90 ± 9,42
45 (A 17) ^{ns}	27,9 ± 0,04	6,01 ± 0,49	6,77 ± 1,28	75 ± 13,43
45 (A 18) ^{ns}	28,2 ± 0,01	6,03 ± 0,03	6,82 ± 1,31	60 ± 15,87

Tratamentos	T(°C)	O2(mg/L)	pH	Alcalinidade	(N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) mg-L
7 (N 19) ^{ns}	28,3 ± 0,21	5,98 ± 0,07	6,75 ± 0,98	94 ± 10,34	0,042 ± 0,004
7 (N 20) ^{ns}	28,0 ± 0,01	5,86 ± 0,56	7,02 ± 1,31	85 ± 11,98	0,037 ± 0,007
7 (N 21) ^{ns}	28,1 ± 0,01	6,13 ± 0,34	7,13 ± 0,05	100 ± 5,43	0,040 ± 0,012
7 (N 22) ^{ns}	27,8 ± 0,50	5,97 ± 0,01	6,78 ± 1,23	109 ± 5,25	0,038 ± 0,003
7 (N 23) ^{ns}	28,1 ± 0,03	6,10 ± 0,67	6,56 ± 0,89	103 ± 5,67	0,034 ± 0,023
7 (N 24) ^{ns}	27,6 ± 0,23	6,09 ± 0,47	6,78 ± 0,51	85 ± 11,23	0,028 ± 0,010
21 (N 25) ^{ns}	28,2 ± 0,26	6,02 ± 0,12	6,46 ± 1,86	98 ± 8,56	0,037 ± 0,009
21 (N 26) ^{ns}	28,0 ± 0,32	5,89 ± 0,34	6,91 ± 0,43	111 ± 2,35	0,028 ± 0,013
21 (N 27) ^{ns}	27,7 ± 0,55	6,04 ± 0,45	6,76 ± 1,03	105 ± 4,62	0,062 ± 0,005
21 (N 28) ^{ns}	27,9 ± 0,05	5,98 ± 0,96	7,01 ± 0,75	98 ± 6,78	0,041 ± 0,024
21 (N 29) ^{ns}	27,6 ± 0,02	6,16 ± 0,26	6,55 ± 1,26	87 ± 11,20	0,031 ± 0,016
21 (N 30) ^{ns}	27,8 ± 0,46	6,17 ± 0,33	6,84 ± 0,64	95 ± 6,30	0,029 ± 0,027
45 (N 31) ^{ns}	27,9 ± 0,05	5,97 ± 0,09	6,76 ± 1,41	92 ± 11,24	0,029 ± 0,008
45 (N 32) ^{ns}	27,8 ± 0,53	6,03 ± 0,31	6,73 ± 1,45	95 ± 4,22	0,027 ± 0,004
45 (N 33) ^{ns}	28,1 ± 0,07	6,04 ± 0,37	6,43 ± 1,57	107 ± 4,76	0,033 ± 0,011
45 (N 34) ^{ns}	28,2 ± 0,01	5,87 ± 0,76	7,07 ± 1,45	105 ± 03,21	0,025 ± 0,003
45 (N 35) ^{ns}	28,0 ± 0,01	6,11 ± 0,25	6,96 ± 1,34	120 ± 1,76	0,037 ± 0,018
45 (N 36) ^{ns}	27,9 ± 0,01	6,10 ± 0,67	6,82 ± 0,09 a	110 ± 2,45	0,035 ± 0,021

^{ns} – Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 5 – Valores médios da concentração nominal e real para a amônia total (N-NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂) durante 96h de experimento de toxicidade aguda com *Betta splendens* com sete dias de vida .

Contaminantes		Concentrações						
Amônia Total (mg-L)	Nominal	0	35	42	50	65	80	
	Real	0	36,71± 0,84	43,36± 0,33 b	47,11± 1,01	63,10± 0,91 d	81,91± 0,58 e	
			a		c			
Nitrito (mg-L)	Nominal	0	25	50	75	100	125	
	Real	0	26,13± 0,23 a	52,13± 0,81 b	71,24± 0,76	101,11± 0,84	127,87± 1,15	
					c	d	e	

Médias ± desvio-padrão seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Tabela 6– Valores médios da concentração nominal e real para amônia total (N-NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂) durante 96h de experimento de toxicidade aguda com *Betta splendens* com 21 dias de vida .

Contaminantes		Concentrações						
Amônia Total (mg-L)	Nominal	0	50	65	80	87	95	
	Real	0	47,27± 0,73 a	68,23± 0,82 b	76,87± 1,33 c	89,1± 0,59 d	99,73± 0,91 e	
Nitrito (mg-L)	Nominal	0	50	75	100	125	175	
	Real	0	51,72± 0,25 a	72,48± 0,46 b	97,77± 0,77 c	127,23± 1,25	170,41± 1,03 e	
						d		

Médias ± desvio-padrão seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Tabela 7 – Valores médios da concentração nominal e real para a amônia total (N-NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂) durante 96h de experimento de toxicidade aguda com *Betta splendens* com 45 dias de vida.

Contaminantes		Concentrações						
Amônia Total (mg-L)	Nominal	0	125	135	145	155	165	
	Real	0	122,34± 1,10 a	140,1± 0,76 b	144,32± 1,51 c	159,34± 0,65 d	162,98± 0,52 e	
Nitrito (mg-L)	Nominal	0	120	160	200	240	280	
	Real	0,01	119,40± 0,38 a	156,46± 0,93 b	202,31± 1,04 c	238,79± 0,99 d	277,45± 0,86 e	

Médias ± desvio-padrão seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Foi possível observar o efeito da toxicidade da amônia e do nitrito já nas primeiras 24 h de exposição. Os animais de sete dias de vida expostos à amônia apresentaram 15% de mortalidade na concentração de 35 mg-L, 60% de mortalidade na concentração de 65 mg-L e 100% de mortalidade na concentração de 80 mg-L, ao final do teste os animais expostos a 35 mg-L apresentaram 70% de sobrevivência. Os animais da mesma idade expostos ao nitrito apresentaram mortalidade de 85% na concentração de 125 mg-L e apresentaram 40 % de sobrevivência ao final das 96h de teste aguda na concentração de 35 mg-L (Tab. 8 e 9). Já para os animais de 21 dias de vida a mortalidade total em 24 horas foi observada na maior concentração 95 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺) e para o nitrito a mortalidade total em 24 horas

ocorreu na concentração de 100 mg-L (Tab. 10 e 11). Similar aos animais de 7 dias de vida expostos à amônia, os animais de 45 dias de vida apresentaram 15% de mortalidade na concentração de 135 mg-L, 60% na concentração de 155 mg-L e 100% de mortalidade na concentração de 165 mg-L, já os animais da mesma idade expostos ao nitrito apresentaram 100% de mortalidade em 24h de teste na maior concentração 280 mg-L (Tab. 12 e 13). As concentrações letais medianas foram estimadas a partir das mortalidades observadas para cada tratamento testado durante 96h de teste, foram estimadas a CL50 para 24, 48, 72 e 96 horas e o nível de segurança para cada idade do peixe ornamental *B. splendens* de acordo com Sprague (1971) (tab.14).

Tabela 8. Percentual de mortalidade (%) de *Betta splendens* com 7 dias de vida expostos a várias concentrações de amônia durante 96 h e valores de CL₅₀ de amônia total e gasosa e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.

Tempo de Exposição (h)	Amônia (N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) mg-L						CL50 amônia (N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) (mg-L)	CL50 amônia (N-NH ₃) (mg-L)
	0.0	35	42	50	65	80		
24	0	15	0	0	60	100	55,54 (50,44 – 61,16)	0,61 (0,55 – 0,67)
48	0	30	30	95	100	100	44,32 (42,62 – 46,07)	0,49 (0,47 – 0,51)
72	0	30	100	100	100	100	36,87 (35,54 – 38,56)	0,41 (0,39 – 0,42)
96	0	30	100	100	100	100	36,87 (35,54 – 38,56)	0,41 (0,39 – 0,42)

Tabela 9. Percentual de mortalidade (%) de *Betta splendens* com 7 dias de vida expostos a várias concentrações de nitrito durante 96 h e valores de CL₅₀ de nitrito e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.

Tempo de Exposição (h)	Nitrito (N-NO ₂) mg-L							CL ₅₀ nitrito (N-NO ₂) (mg-L)
	0.0	35	50	75	100	125		
24	0	0	0	0	0	85	114,03 (111,25 - 116,87)	
48	0	0	10	85	100	100	61,06 (55,68 - 66,95)	
72	0	25	35	100	100	100	51,55 (39,78 - 66,79)	
96	0	60	100	100	100	100	Não calculado	

Tabela 10. Percentual de mortalidade (%) de *Betta splendens* com 21 dias de vida expostos a várias concentrações de amônia durante 96 h e valores de CL₅₀ de amônia total e gasosa e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.

Tempo de Exposição (h)	Amônia (N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) mg-L						CL50 amônia (N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) (mg-L)	CL50 mônia (N-NH ₃) (mg-L)
	0.0	50	65	80	87	95		
24	0	0	0	0	0	100	90,91 (87,77– 91,28)	1,001(0,97 - 1,004)
48	0	5	5	85	35	100	73,89 (71,52 – 76,34)	0,81 (0,79- 0,84)
72	0	20	20	85	100	100	67,54 (66,67 – 68,78)	0,74 (0,67 - 0,76)
96	0	40	50	85	100	100	61,19 (49,08 – 76,28)	0,67 (0,54 - 0,42)

Tabela 11. Percentual de mortalidade (%) de *Betta splendens* com 21 dias de vida expostos a várias concentrações de nitrito durante 96 h e valores de CL₅₀ de nitrito e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.

Tempo de Exposição (h)	Nitrito (N-NO ₂) mg-L						CL50 nitrito (N-NO ₂) (mg-L)
	0.0	50	75	100	125	175	
24	0	0	0	40	10	100	129,85 (121,39 - 138,90)
48	0	0	0	65	100	100	94,70 (89,68 - 100,00)
72	0	35	25	100	100	100	82,55 (71,74 - 91,98)
96	0	70	100	100	100	100	Não calculado

Tabela 12. Percentual de mortalidade (%) de *Betta splendens* com 45 dias de vida expostos a várias concentrações de amônia durante 96 h e valores de CL₅₀ de nitrito e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.

Tempo de Exposição (h)	Amônia (N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) mg-L						CL50 amônia (N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) (mg-L)	CL50 mônia (N-NH ₃) (mg-L)
	0.0	125	135	145	155	165		
24	0	0	15	0	60	100	152,88 (151,98 - 153,79)	1,69 (1,67– 1,69)
48	0	35	40	10	100	100	152,48 (152,34 - 152,88)	1,68 (1,67 – 1,69)
72	0	40	45	40	100	100	152,04 (151,55 - 152,79)	1,67 (1,66 – 1,68)
96	0	40	50	60	100	100	132,94 (126,88 - 139,39)	1,46 (1,40 – 1,53)

Tabela 13. Percentual de mortalidade (%) do *Betta splendens* com 45 dias de vida exposta a várias concentrações de nitrito (N-NO₂) durante 96 h e valores de CL₅₀ do nitrito e seus respectivos intervalos de confiança entre parênteses.

Tempo de Exposição (h)	Nitrito (N-NO ₂) mg-L						CL50 nitrito (N-NO ₂) (mg-L)
	0.0	120	160	200	240	280	
24	0	0	0	0	0	100	259,23 (252,88 – 261,31)
48	0	0	0	0	95	100	220,94 (217,35 – 224,59)
72	0	0	35	85	100	100	166,94(157,08 – 177,92)
96	0	5	75	100	100	100	141,96 (135,60 – 148,62)

Tabela 14 – Níveis de Segurança de amônia (total, não ionizada) e nitrito para *Betta splendens* em três diferentes idades.

Nível de segurança	Animais (7 dias)	Animais (21 dias)	Animais (45 dias)
Amônia Total (mg/L)	3,69	6,12	13,29
Amônia Gasosa (mg/L)	0,04	0,07	0,15
Nitrito (mg/L)	5,15	8,25	14,20

As lesões observadas durante o teste agudo de amônia e nitrito e a frequência em que ocorreram foram mostradas nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Alterações histológicas encontradas nas brânquias de *Betta splendens* expostas as crescentes concentrações de Amônia

Lesão nas brânquias	Concentração (N-NH ₃ + NH ₄ ⁺) mg-L														
	7 dias					21 dias					45 dias				
	35	42	50	65	80	50	65	80	87	95	125	135	145	155	165
Hiperplasia do epitélio lamelar	0	+	+	+	0+	0	0+	0+	+	+	0+	+	+	+	+
Fusão incompleta de várias lamelas	+	++	++	++	+++	+	++	+	+	+	++	+++	+	+	+++
Fusão completa de todas as lamelas	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0+	0+	+
Fusão completa de várias lamelas	+	+	0	0	++	0	0	0+	+	0+	0	0	0+	+	++
Aneurisma lamelar	0	0	0	0	0	0	0	0	0+	0	0	0	0	0	0
Hipertrofia do epitélio lamelar	0	0	+	+	+	0	0	0+	0+	0+	0+	+	0+	+	+
Desprendimento epitelial	++	++	++	+++	++	0+	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
Dilatação do seio sanguíneo	0+	0	0	0+	+	+	0+	+	++	0+	0+	0+	0+	+	+
Necrose	0	0	0	0	0+	0	0	0	0	0+	0	0	0+	0+	0+

0= ausente; 0+ = raro; + pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente

* Brânquias de cinco animais de cada concentração foram escolhidas aleatoriamente. As lesões foram contadas e a média de cada lesão foi usada como parâmetro para explicar a frequência das alterações. (0-5) raro; (5-10) pouco frequente; (10-15) frequente; > 15 muito frequente.

Tabela 16. Alterações histológicas encontradas nas brânquias de *Betta splendens* expostas as crescentes concentrações de nitrito.

Lesão nas brânquias	Concentração (N-NO ₂) mg-L														
	7 dias					21 dias					45 dias				
	25	50	75	100	125	50	75	100	125	175	120	160	200	240	280
Hiperplasia do epitélio lamelar	0	0	0+	+	0+	0	0+	0+	+	+	0+	+	+	+	+
Fusão incompleta de várias lamelas	++	++	++	++	++	0+	+	+	+	+	++	+++	+	+	++
Fusão completa de todas as lamelas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0+	0	0	0+	0+	+
Fusão completa de várias lamelas	+++	+	0	0	++	0	0	0	0+	0+	0	0	0+	+	+
Aneurisma lamelar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipertrofia do epitélio lamelar	0	0	+	+	+	0	0	0+	0+	0+	0+	+	0+	0+	+
Desprendimento epitelial	++	++	++	+++	++	+	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Dilatação do seio sanguíneo	0+	0	0	0+	+	0	0	0+	0	0+	0+	0+	0+	+	+
Necrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0= ausente; 0+ = raro; + pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente

* Brânquias de cinco animais de cada concentração foram escolhidas aleatoriamente. As lesões foram contadas e a média de cada lesão foi usada como parâmetro para explicar a frequência das alterações. (0-5) raro; (5-10) pouco frequente; (10-15) frequente; > 15 muito frequente.

No presente estudo não foram observadas alterações nas brânquias dos animais expostos ao tratamento controle (Fig 6. A,C,E). Já nos animais de sete dias exposto a 80 mg-L $\text{N-NH}_3+\text{NH}_4^+$ foi observado hiperplasia e fusão lamelar (Fig 6. B). Foi observado elevação epitelial nos animais de 21 dias de vida a partir da concentração de 50 mg-L $\text{N-NH}_3+\text{NH}_4^+$ e a partir de 135 mg-L de amônia total nos animais de 45 dias. Entretanto, essas alterações foram observadas em maior quantidade nas maiores concentrações conforme figura 6 D e 6 F.

Alterações histológicas como aneurisma, proliferação celular, destacamento do epitélio, edema intersticial, dilatação capilar, perda da integridade da lamela, necrose, hiperplasia também foram encontradas neste estudo (Fig.6).

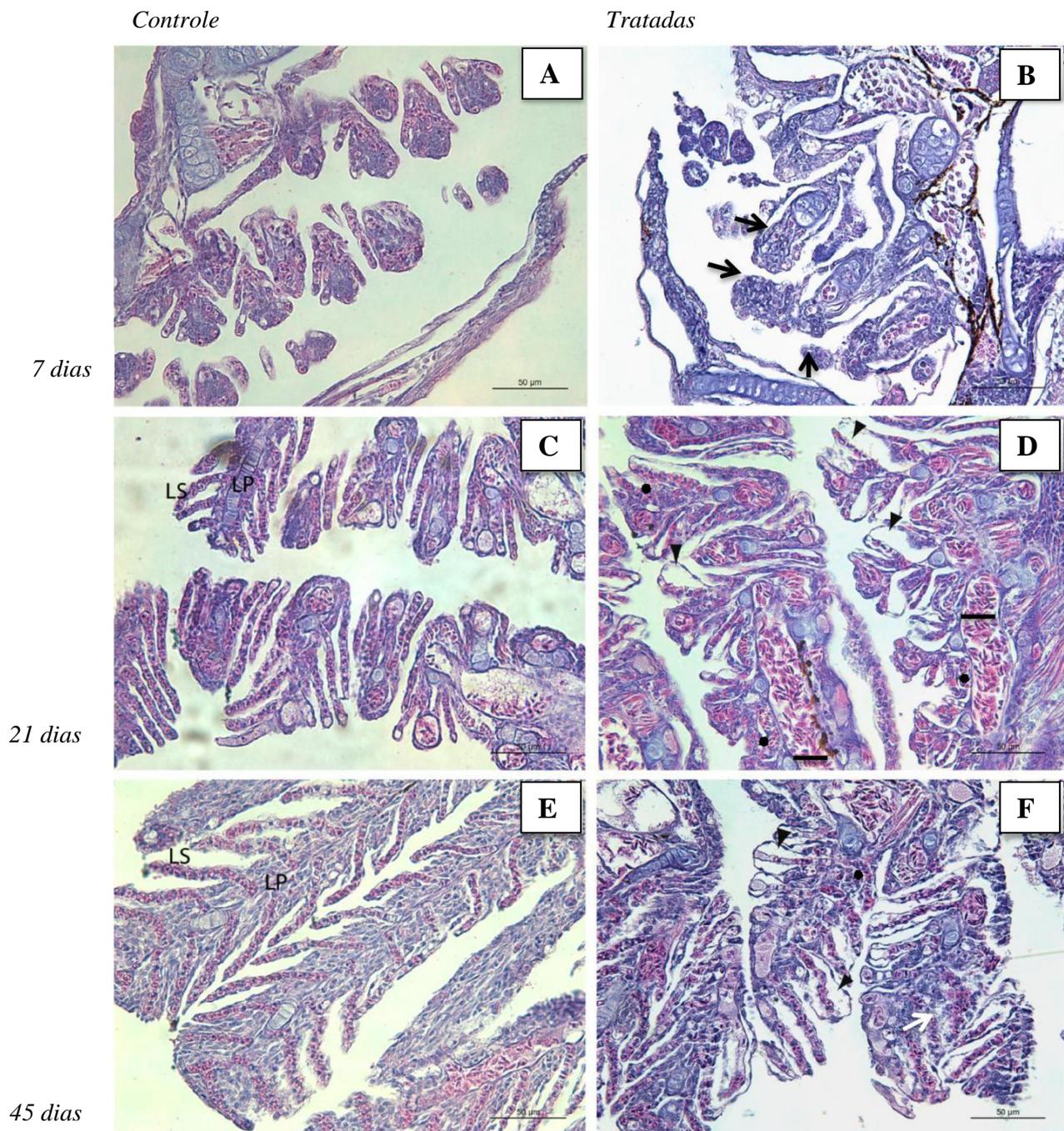


Figura 6. Fotomicrografias de brânquia de juvenis de *Betta splendens* expostos a concentrações agudas de amônia de 24 a 96 h. Coloração hematoxilina, eosina. **A, C e E** Brânquias de peixe do grupo controle com 7, 21 e 45 dias de vida respectivamente exibindo brânquias em formação, lamela primária (LP) e lamela secundária (LS). **B,D e F** Brânquias de betta com sete dias de vida exposto a 80 mg-L N-NH₃ + NH₄⁺, brânquias de betta com 21 dias de vida exposto a 95 mg-L N-NH₃ + NH₄⁺ e brânquias de betta com 45 dias de vida exposto a 165 mg-L N-NH₃ + NH₄⁺ respectivamente. Observe as alterações branquiais dos animais expostos à amônia, fusão lamelar (seta preta), aneurisma (círculo preto), desprendimento epitelial (cabeça de seta preta), dilatação capilar (traço), aumento da célula de cloreto (seta branca), perda da integridade da lamela e necrose (seta branca). Barras: 50 µm. Aumento: A, C -10x; B - 20x; D, E,F - 40x.

Os animais de 21 dias do tratamento controle apresentaram brânquias com lamelas primárias e secundárias bem definidas e a superfície epitelial bem organizada (Fig. 7A e 7B). Na figura 2B observam-se células pavimentosas com aspecto mais homogêneo e alguns limites celulares visíveis, enquanto que em outras regiões da brânquia, animais expostos a 95 mg-L N-NH₃ + NH₄⁺ (Fig. 7D) esses limites celulares são poucos definidos por depressões entre as células, os filamentos branquiais primários e secundários tem um aspecto mais rugoso e apresentam descamação nas lamelas devido a fragilidade do tecido quando comparado ao grupo controle (Fig. 7C).

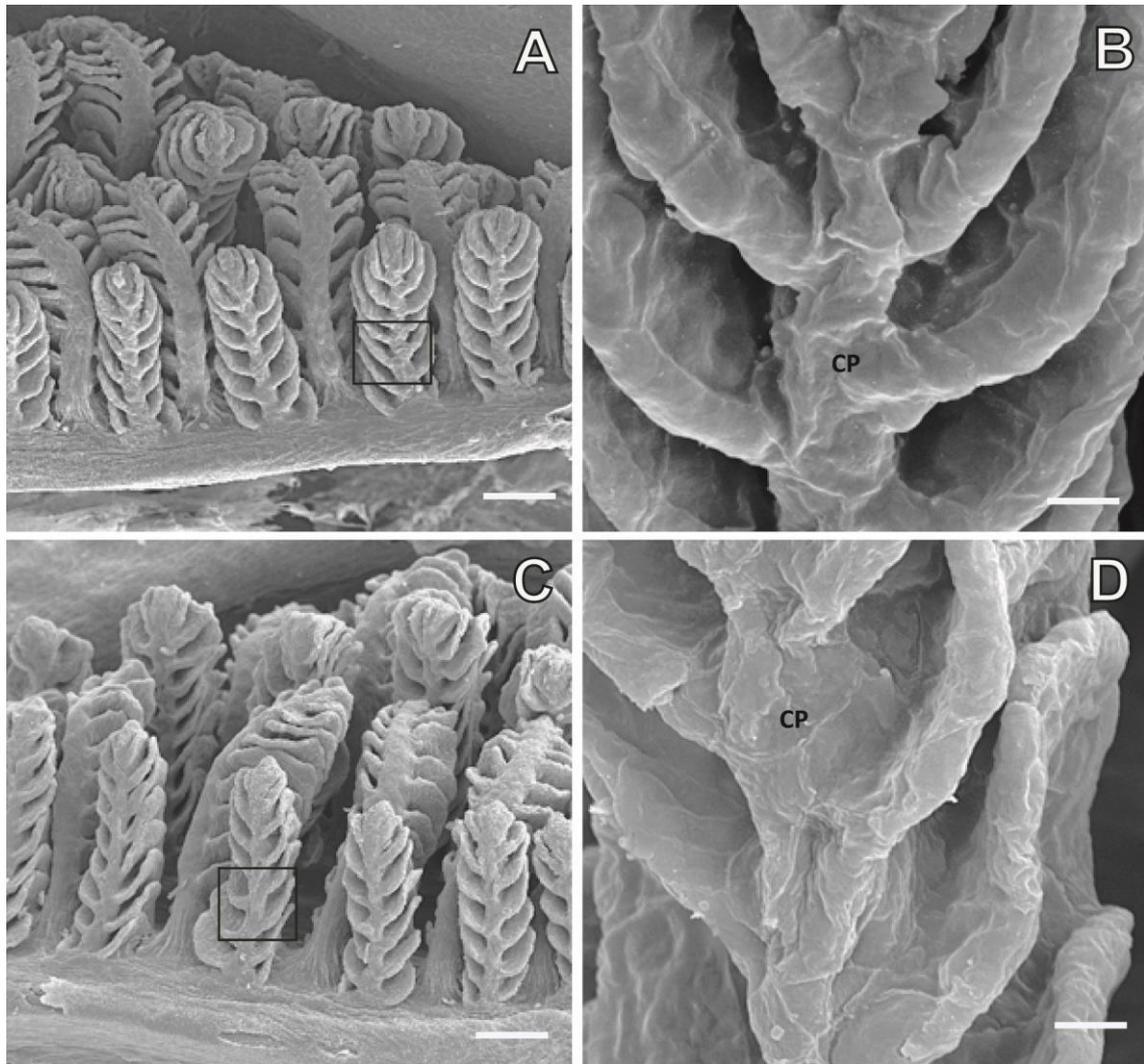


Figura 7: Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe *Betta splendens*. Animais de 21 dias **A e B** tratamento controle. **C e D** animais expostos ao tratamento com 95 mg-L N-NH₃ + NH₄⁺ (amônia total). Células pavimentosas bem definidas nas lamelas primárias e secundárias (setas). (CP) células pavimentosas. **A e C** aumento x260, barra 43 µm. **B e D** aumento x2000, barra 6 µm.

As brânquias nos indivíduos de 45 dias de vida do tratamento controle (Fig. 8A e B) seguiram a morfologia padrão para espécies de teleósteos, o que demonstra uso de indivíduos saudáveis e sem registro de qualquer alteração morfológica. Já as análises histológicas dos indivíduos expostos à 165 mg-L N-NH₃ + NH₄⁺ (Fig. 8 C e D) apresentaram uma desorganização nas lamelas secundárias, com bordas irregulares e aumento de volume quando comparado ao grupo controle.

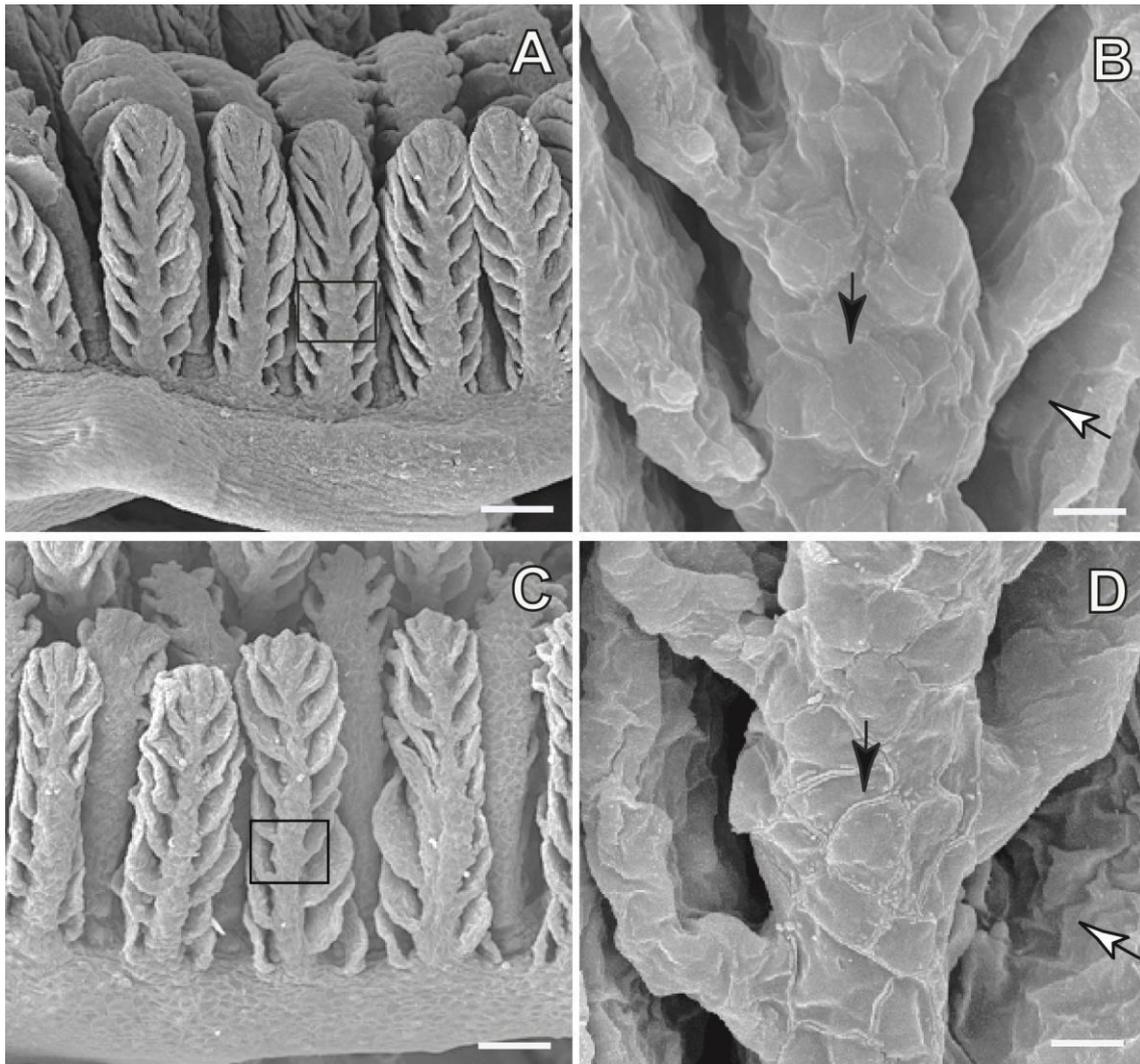


Figura 08: Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe *Betta splendens* animais de 45 dias de vida. **A e B** grupo controle. **C e D** animais tratados com 165 mg-L N-NH₃ + NH₄⁺. **B** as células pavimentosas das lamelas primárias (seta) e lamelas secundárias (setas claras) apresentam suave delimitação sem micropregas o que é evidente em **D** nas lamelas secundárias (setas claras) as lamelas primárias apresentam as células pavimentosas bem delimitadas. **A e C** aumento x260, barra 43 µm. **B e D** aumento x2000, barra 6 µm

Em relação ao comportamento os animais expostos as crescentes concentrações de nitrito se apresentaram mais debilitados nas primeiras 24 horas em relação ao grupo controle, os animais apresentaram natação erradica, lentidão para capturar o ar atmosférico, respiração ofegante, não se alimentaram e permaneceram inertes no fundo dos béqueres. No referido estudo entre 24 e 48 horas os animais expostos nas concentrações de 50 mg-L N-NO₂ animais de sete dias, 75 e 100 mg-L N-NO₂ animais de 21 dias e 160 e 200 mg-L N-NO₂ animais de 45 dias apresentaram mudanças comportamentais comparadas ao comportamento observado

no início do experimento, os animais começaram a se alimentar e a nadar normalmente. Já após 24 horas, nas concentrações de 125mg-L animais de 7 dias, 175 mg-L animais de 21 dias e 280 mg-L animais de 45 dias apresentaram taxa de mortalidade de 75%, 100%, 100% respectivamente.

Não foram observadas alterações nas brânquias dos animais expostos ao tratamento controle (Fig 9. A,C,E).

As alterações observadas nos animais expostos as crescentes concentrações de nitrito foram fusão lamelar, hiperplasia, proliferação celular e desprendimento do epitélio (Fig 9). Desprendimento do epitélio, fusão lamelar e hiperplasia foram as lesões mais encontradas nos animais amostrados em todas as concentrações. Menos frequente nos animais expostos às menores concentrações e mais frequente com o aumento das concentrações de nitrito para as três idades.

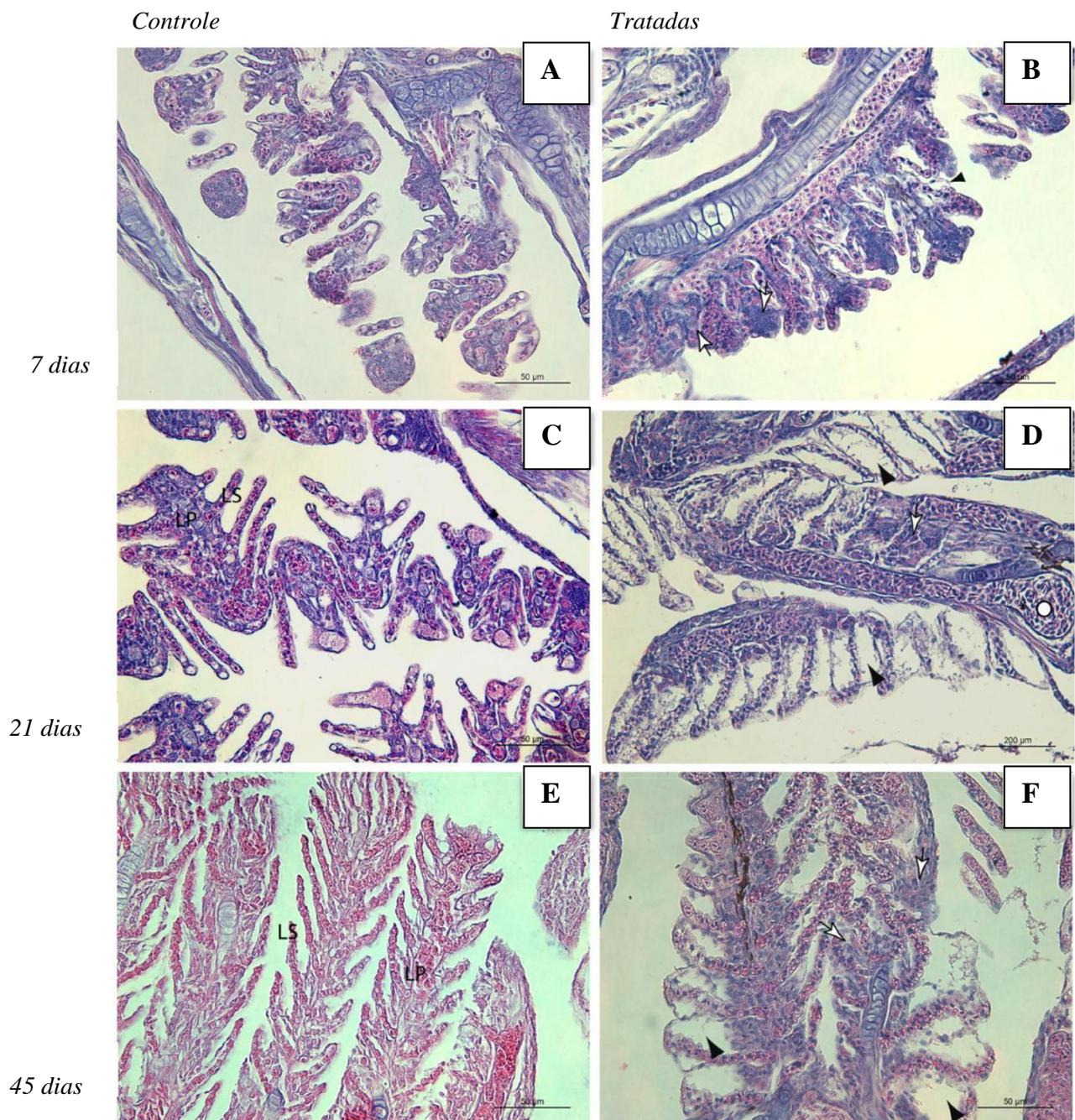


Figura 9. Brânquias de peixes *Betta splendens* expostas a diferentes concentrações de N-NO₂ durante 96h de teste agudo. Coloração hematoxilina, eosina. **A, C e E** Brânquias de peixe do grupo controle com 7, 21 e 45 dias de vida respectivamente exibindo brânquias em formação, lamela primária (LP) e lamela secundária (LS). **B** Brânquias de *B. splendens* com sete dias de vida exposto a 125 mg/L N-NO₂. **C** brânquias de *B. splendens* com 21 dias de vida exposto a 175 mg/L N-NO₂. **D** brânquias de *B. splendens* com 45 dias de vida exposto a mg/L 280 de N-NO₂. Observe as alterações branquiais dos animais expostos a nitrito, fusão lamelar total e hiperplasia (seta branca), desprendimento epitelial (cabeça de seta preta), proliferação celular (círculo branco). **A,B,C,E, F** barras: 50 µm. **D** barra 50 µm. Aumento: A, B- 10x; C, E – 20x; D, F – 40x

Na (Fig. 10) é possível observar as células pavimentosas bem delimitadas. Na (Fig. 10 A e 10 B) as células pavimentosas possuem aspecto mais homogêneo quando comparada as

células pavimentosas das brânquias dos animais expostos a 280mg/L N-NO₂, que além de apresentar a superfície mais enrugada apresenta também células sanguíneas protuberantes na superfície das lamelas (Fig. 10C, 10D, 11A e 11B).

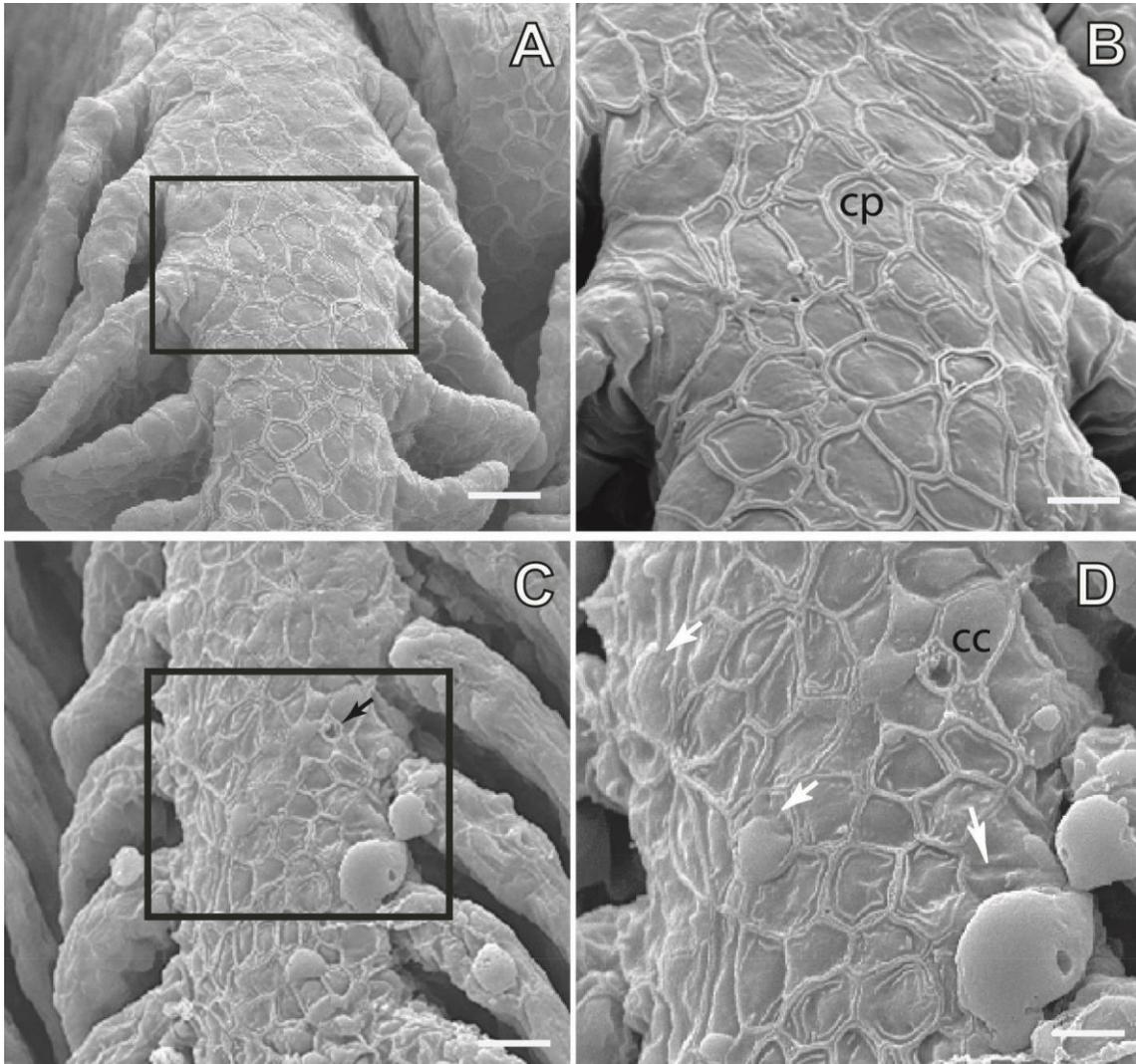


Figura 10: Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe *Betta splendens* animais de 45 dias de vida. **A** e **B** grupo controle, (sem adição de nitrito). **C** e **D** animais tratados com 280 mg/L N-NO₂. Em **A** e **B** é possível observar o nítido contorno das células pavimentosas (CP) com poucas micropregas dando um aspecto mais liso a membrana e a presença de uma célula de cloreto (CC, seta preta). Em **C** e **D** as células pavimentosas também apresentam contorno nítido com liberação de células sanguíneas, presença de saliências nas células pavimentosas (setas claras). **A** e **C** aumento x1000, barra 12 µm. **B** e **D** aumento x2000, barra 6 µm

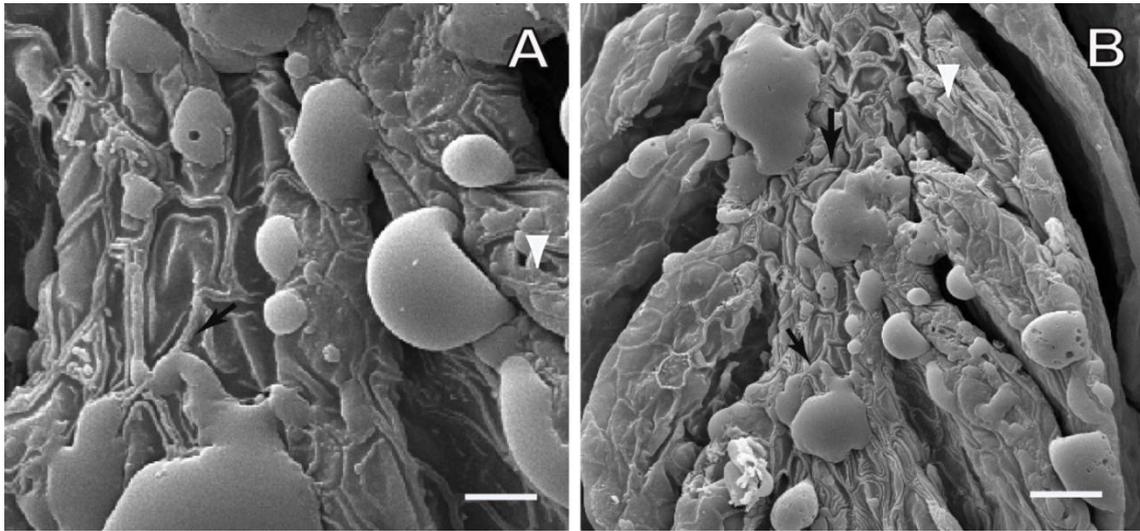


Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura da superfície do epitélio branquial do peixe *Betta splendens* animais de 45 dias de vida. **A** e **B** animais tratados com 280 mg/L N-NO₂. É possível observar contorno das células pavimentosas (CP) com maior protuberância (seta), células com aspecto mais rugoso (cabeça de seta clara), células pavimentosas com liberação de células sanguíneas (círculo branco), espaço interlamelar pouco visível (traço preto). **A** aumento x3000, barra 3,75 µm. **B** aumento x1000, barra 12 µm.

4. DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água analisados neste estudo se encontravam em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais em geral (Huet, 1983). Os valores de temperatura ficaram entre os desejados para cultivo de *B. splendens*, que varia entre 23°C a 34°C (Sugai, 1993). Da mesma forma o valor de pH estava dentro dos limites ideais para a produção do beta que é de 6,8 a 7,2 (Parisi, 2017). Já os valores de oxigênio estiveram quase em sua maioria superiores a 6mg-L, ideais para garantir um bom desenvolvimento dos peixes (Cyrino et al., 2012).

Os compostos nitrogenados são considerados compostos tóxicos sendo encontrados naturalmente em ambientes aquáticos. Podem ter sua concentração aumentada pela decomposição de matéria orgânica, pela adição de fontes antropogênicas como despejo de efluentes, excesso de ração (aquicultura) e pela rota metabólica dos animais aquáticos. A amônia é o principal produto nitrogenado excretado pela maioria dos organismos aquáticos. De acordo com Handy e Poxton (1993), a amônia representa geralmente 75-90% da excreção nitrogenada.

Numerosos estudos relatam os efeitos da toxicidade de compostos nitrogenados em peixes de água doce (Arillo et al., 1984; Hilmy et al., 1987; Knudsen e Jensen, 1997; Alcaraz

e Espina, 1997; Vedel et al., 1998; Huang e Chen, 2002; Huertas et al., 2002; Grosell e Jensen, 1999; Lin e Chen, 2003, Kroupova et al., 2008; Miron et al., 2008). No entanto, a carência de conhecimento da toxicidade gerada por compostos nitrogenados em peixes ornamentais é preocupante. Os valores de CL₅₀ são empregados para comparar a tolerância das diferentes espécies frente a intoxicação por elementos e compostos químicos. As tabelas 17 e 18 mostram o efeito letal causado pela amônia e pelo nitrito sobre peixes em diferentes fases de desenvolvimento.

Tabela 17. Diferentes resultados de CL₅₀ (nitrito) de acordo com os parâmetros, peso, tamanho, temperatura e pH.

Espécie	Tamanho (cm)	Peso (g)	Temp (C⁰)	pH	CL₅₀ mg/L NO₂	Autor
<i>Brycon cephalu</i> (matrinxã)	-	90±5	25	6,8	0,86	Avilez et al. (2004)
<i>Betta splendens</i> (beta)	0,4	0,036	28	7,2	51,55	Presente estudo
<i>Betta splendens</i> (beta)	0,8	0,208	28	7,2	82,55	Presente estudo
<i>Betta splendens</i> (beta)	2,1	0,687	28	7,2	166,94	Presente estudo
<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Carpa capim)	-	0,045	22	8,4	10,6	Alcaraz e Espina (1997)
<i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia)	4,9	1,8	25	7,94	28.18	Yanbo et al. (2006)
<i>Siganus rivulatus</i> (Macua)	8,6	8,1	27	8,02	105	Saoud (2014)

A toxicidade da amônia para peixes depende em grande parte da concentração de amônia não ionizada no meio aquático. Em elevadas temperaturas e com o pH mais alto, a fração de amônia não ionizada ou gasosa (NH₃) aumenta causando toxicidade aos peixes (Arana, 1997). A forma não ionizada da amônia é de natureza lipofílica. Tal característica permite que ela se difunda por meio do epitélio branquial causando uma série de lesões que podem levar a morte do animal (Roumieh et al., 2012).

Tabela 18. Diferentes resultados de CL₅₀ (amônia) de acordo com os parâmetros, peso, tamanho, temperatura e pH.

Espécie	Tamanho (cm)	Peso (g)	Temp (C⁰)	pH	CL 50 mg/L N-NH₃	Autor
<i>Abramis brama</i> (brema)	11,1	15,8	12,6	7,75	0,41	Ball (1987)
<i>Betta splendens</i> (betta)	0,4	0,036	28	7,2	0,41	Presente estudo
<i>Betta splendens</i> (betta)	0,8	0,208	28	7,2	0,67	Presente estudo
<i>Betta splendens</i> (betta)	2,1	0,687	28	7,2	1,46	Presente estudo
<i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia)	-	12,6	30	7,58	0,98	Evans et al. (2006)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truta-arco-íris)	-	10,9	3,6	7,7	0,26	Athur et al. (1987)
<i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia)	-	10,11	23	7,2	7,39	Benli e Köksal (2005)
<i>Perca Fluviatilis</i> (Perca)	10,1	14,0	10.1	7,75	0,29	Ball (1987)
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu)	1,6	1,2	15	7,0	0,009	Barbieri e Doi. (2013)
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu)	1,6	1,2	20	7,0	0,012	Barbieri e Doi (2013)
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu)	1,6	1,2	25	7,0	0,014	Barbieri e Doi (2013)
<i>Rhamdia quelen</i> (jundiá)	-	11,04	24	6,0	0,44	Miron et al. (2008)
<i>Rhamdia quelen</i> (jundiá)	-	11,07	24	7,0	1,45	Miron et al. (2008)
<i>Rhamdia quelen</i> (jundiá)	-	11,04	24	8,2	2,09	Miron et al. (2008)
<i>Rutilus rutilus</i> (pardelha)	8,8	8,6	11,9	7,86	0,35	Ball (1987)

De acordo com Pillay e Kutty (2005) os níveis de metabólitos dissolvidos (amônia e nitrito) no ambiente aquícola são preocupantes e possuem importância principalmente em sistemas intensificados de cultivo, em sistemas fechados e durante o transporte de animais vivos, pois a presença desses compostos demanda atenção mesmo em baixas concentrações. Assim, concentrações inferiores a 0,5 mg-L de amônia não ionizada, 1 mg-L de nitrito para

peixes marinhos e 0,1 mg-L de nitrito para peixes de água doce podem interferir no cultivo de animais aquáticos.

De acordo com Martinez et al. (2006), a concentração de 0,16 mg-L de amônia não ionizada podem afetar o desenvolvimento, reprodução e crescimento de espécies neotropicais. Já Boyd e Tucker (1998) estabeleceram limites de amônia total para viveiros entre 2,0 a 3,0 mg-L e de 0,4 a 2,0 mg-L de amônia não ionizada (NH_3) para a maioria dos peixes e crustáceos de águas quentes.

Muitos autores têm estudado a toxicidade da amônia em peixes teleósteos. Ostrensky e Brugger (1992) encontraram o valor de 0,80 mg-L de N- NH_3 para alevinos de *Odontesthes argentinensis* (peixe rei). Sampaio e Minillo (2000) também estudaram larvas de *Odontesthes argentinensis* de 15 dias de idade, estes autores determinaram a CL_{50} entre 0,73 e 0,96 mg-L de N- NH_3 . Já Pietras (2006) avaliou a toxicidade da amônia não ionizada em alevinos de cará (*Cichlasoma facetum*) com peso médio de 1,56 g e comprimento médio de 4,29 cm. O referido autor estimou uma CL_{50} (96 h) de 2,95 mg-L N- NH_3 .

Martinez et al. (2006) estimaram a CL_{50} (24h) N- NH_3 para lambari do rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) de 11,83g, Pacu (*Colossoma macropomus*) de 22,93g e Curimba (*Prochilodus lineatus*) de 13,15g. Os autores encontraram como resultado os valores de 0,66 mg-L, 0,85 mg-L e 0,74 mg-L N- NH_3 respectivamente. Comparando esses valores com os resultados de CL_{50} (24H) encontrados no estudo, 1,69 mg-L N- NH_3 (animais 45 dias), 1,00 mg-L N- NH_3 (animais 21 dias) e 0,61 mg-L NH_3 (animais de sete dias) evidenciam maior tolerância da espécie *B. splendens* frente a exposição à amônia não ionizada.

Miron et al. (2008) trabalharam com juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* e estimaram a concentração de 0,01mg-L N- NH_3 segura para o crescimento e desenvolvimento do animal. De acordo com os autores concentrações de 0,22 e 0,42 mg-L N- NH_3 em pH 8,2 apresentam uma relação negativa significativa entre sobrevivência, comprimento, ganho de peso diário, taxa de crescimento padrão e biomassa por tanque de juvenis de jundiá. Oliveira et. al. (2008) trabalharam com o peixe ornamental do Amazonas cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*) com peso de 0.07 ± 0.002 g e estimaram a CL_{50} de N- NH_3 em 0,36 mg/L N- NH_3 .

Os resultados de CL_{50} (96h) estimados no presente estudo para animais de 7, 21 e 45 dias foi de 0,41; 0,67; 1,46 mg-L de N- NH_3 , respectivamente. Estes valores diferem do valor relatado por Ruffier et al. (1981) que sugere um valor próximo de 0,82 mg-L de CL_{50} (96h) de N- NH_3 para os teleósteos dulcícolas em geral. Entretanto, os valores encontrados no

estudo para as idades de 21 e 45 dias de vida estão dentro da faixa de amônia tóxica relatadas por Queiroz et al. (2007), entre 0,6 e 2,0 mg-L N-NH₃, para a maioria das espécies cultivadas.

Comparando todos os valores já apresentados de CL₅₀ ao obtido no presente estudo (*B. splendens* com 7 dias vida, 0,036g = 0,41 mg-L N-NH₃). Pode-se dizer que apesar do menor tamanho, a tolerância do beta à intoxicação causada pela amônia é considerada elevada mesmo nos primeiros dias de vida. O tamanho pode influenciar a tolerância do peixe à amônia, já que peixes menores são expostos a uma dosagem mais elevada por unidade de peso corporal do que peixes maiores, possuem uma maior relação superfície:volume e os peixes nas primeiras fases de desenvolvimento são normalmente mais suscetíveis à intoxicação por poluentes (Piedras et al., 2006). O estudo com as diferentes idades de *B. splendens* corrobora o que fora descrito, tanto para a intoxicação por amônia quanto para nitrito.

O estudo do comportamento animal frente a intoxicação aos compostos nitrogenados foi realizado por observações diárias.

A alimentação foi o primeiro parâmetro comprometido observado neste estudo, tanto para amônia quanto para nitrito. Em seguida, os peixes perderam o equilíbrio e o comportamento de natação tornou-se errático. Os movimentos natatórios dos animais de sete dias ficaram lentos, já os animais de 21 e 45 dias apresentaram natação lateral, natação espiral e esforço para capturar o ar da superfície da água. O comportamento observado nos animais de 7 dias pode ser atribuído ao não desenvolvimento do labirinto, já que nesta fase da vida do animal sua respiração é totalmente branquial, os animais de 21 dias (labirinto em formação) e 45 dias de vida (labirinto formado) não utilizam só as brânquias como aparelho respiratório. Segundo Pereira e Mercante (2005) uma alta exposição à amônia não ionizada pode causar intensa irritação e inflamação nas brânquias além de ser a principal condição para o estabelecimento da Doença Ambiental das Brânquias (DAB), autointoxicação dos peixes que quando expostos a altas concentrações de amônia não conseguem excretar a amônia interna para o meio externo, esta doença geralmente causa grande mortalidade de peixes em piscicultura.

De acordo com Randall e Tsui (2002) a toxicidade dos compostos nitrogenados pode causar uma variedade de sinais clínicos (natação em espiral, dificuldade respiratória, nadadeiras estendidas entre outras). Pesquisas revelam que contaminantes na água são considerados agentes estressores e capazes de perturbar o equilíbrio do organismo, desencadeando respostas teciduais e celulares (Donaldson, 1981; Wendelaar Bonga, 1997; Lappivaara e Oikari, 1999).

Saoud et al. (2014) observaram os mesmos sintomas encontrados no presente trabalho para o peixe spinefoot rabbitfish ou marmoreado (*Siganus rivulatus*) expostos a diferentes concentrações de nitrito. O autor relatou natação errática e falta de orientação dos animais. Ainda de acordo com o mesmo autor a natação errática pode ser consequência do aumento de metahemoglobina no sangue provocando uma diminuição do O₂ disponível para os tecidos.

De acordo com o que fora relatado, compostos nitrogenados mesmo em baixas concentrações podem ser considerados um entrave na produção aquícola. Por isso a importância dos estudos de toxicidade aguda dentro dos sistemas de produção com o objetivo de obter o melhor desempenho zootécnico do animal e evitar prejuízos para o produtor causados por má formação das características ornamentais, baixo crescimento, susceptibilidade a enfermidades e até mesmo massiva mortalidade.

Não foram observadas alterações histológicas nos peixes de 7 dias na concentração de 35 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺), a partir da concentração de 42 mg-L (N-NH₃ + NH₄⁺) foi possível observar alterações como fusão lamelar e hiperplasia. O número de alterações nas brânquias foi proporcional ao aumento das concentrações. Os animais de 7 dias expostos as concentrações de NO₂ apresentaram alterações a partir da concentração de 25 mg-L N-NO₂⁻. Nos animais de 21 dias as alterações foram observadas a partir da concentração de 50 mg-L, foram observadas nesta concentração fusão parcial das lamelas, desprendimento epitelial foi observado a partir de 80 mg-L. Nos animais da mesma idade expostos ao nitrito as modificações foram constatadas a partir de 75 mg-L. Já os animais de 45 dias de vida apresentou deformações nas brânquias a partir das menores concentrações de amônia total e nitrito.

As brânquias foram utilizadas como biomarcadores no teste de toxicidade utilizado no presente trabalho. Os peixes expostos à amônia e nitrito na água apresentaram alterações histológicas como o desprendimento epitelial. Essa alteração tem como finalidade reduzir a funcionalmente do órgão atingido, e desta forma, diminuir a contaminação do animal pela substância tóxica (Bernet et al., 1999). Conforme Winkler et al. (2001) o desprendimento epitelial é uma das primeiras alterações que ocorrem quando o animal está sob algum tipo de estresse. Esta lesão se caracteriza pela elevação do epitélio lamelar que acarreta no aumento da distância de difusão entre a água e o sangue, prejudicando a eficiência das trocas gasosas e o transporte iônico. As lesões encontradas no referido estudo comprovam que à amônia e o nitrito interferiram de forma degenerativa na estrutura do epitélio lamelar, podendo comprometer o sistema respiratório dos peixes.

Células de cloreto participam no processo de osmorregulação e também apresentam modificações no tamanho, forma, número e estrutura quando expostas a poluentes (Pereira e Caetano 2009). No presente estudo, foi observado aumento de tamanho nas células de cloreto nos animais de 21 e 45 dias expostos as concentrações de amônia. Entretanto, essa lesão teve maior incidência nos animais de 21 dias, presumimos que essa lesão foi devido ao animal apresentar o labirinto em formação, parte da respiração do animal ainda é realizada nas brânquias. Geralmente, as células de cloreto se localizam nas lamelas primárias. Porém, na presença de um estressor as células de cloreto, além de ter aumento de volume podem ser encontradas entre as lamelas e na lamela secundária como forma de aumentar a absorção de íons e manter a homeostase iônica e osmótica do animal (Fracácio et al., 2003; Fernandes e Mazon, 2003).

Lesões celulares podem ser desencadeadas pela ação de algum tóxico considerado como agente agressor. A severidade da lesão vai depender de fatores como a intensidade, duração da agressão e o tipo celular. Esses fatores serão determinantes se inibida a ação do tóxico, o órgão acometido irá se recuperar e voltar à normalidade (Bogliolo, 2009).

Os animais de sete dias de vida tiveram como a principal lesão observada no presente estudo a fusão lamelar. De acordo com Bernet et al. (1999) esse tipo de lesão é considerada regressiva, ou seja, reduzem ou levam a perda do órgão comprometendo sua função. Como os animais de sete dias ainda não tem o labirinto formado, segundo Damazio (1992) a respiração nessa fase da vida do beta é totalmente branquial, o que pode ser uma das causas da ocorrência deste tipo de lesão nas brânquias.

Já na fase adulta, o peixe-beta apresenta alta tolerância à condições de hipóxia a partir do desenvolvimento do labirinto (Wolfsheimer, 2003). Animais de 21 dias de vida, labirinto em formação, e os animais de 45 dias de vida, labirinto já formado, apresentaram em sua maioria lesões como desprendimento do epitélio e hiperplasia. Segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundžic (1994) as lesões citadas são consideradas como primeiro estágio, podem ser reversíveis se o agente estressor for retirado. Aneurisma ou congestão vascular pode estar associado a este tipo de lesão, já que ocorre a paralização do sangue em razão do pequeno diâmetro desses capilares causado pelo desprendimento do epitélio (Meletti et al., 2003). Aneurismas ou congestão vascular foram poucos numerosos nas brânquias amostradas no estudo.

As análises histopatológicas realizadas nas brânquias dos peixes amostrados indicaram a presença de diferentes tipos de alterações morfológicas nos tecidos. As principais lesões observadas foram descolamento do epitélio, fusão de lamelas e hiperplasia. Benli e

Köksal (2005) estudaram efeito da intoxicação por amônia em tilápias, e afirmaram que a hiperplasia do epitélio está entre uma das primeiras alterações sofridas pelo animal. Thophon et al. (2003) observaram o desenvolvimento de edema das células epiteliais, aneurismas com algumas rupturas, hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais e de cloreto com uso de outras substâncias intoxicante. A severidade das alterações nas brânquias variou de acordo com o espécime químico e o tempo de exposição (Van der Heuvel et al., 2000; Schwaiger et al., 2004; Garcia Santos et al., 2006). Heath (1987) destaca que a hiperplasia é o aumento da proliferação celular e pode levar a fusão das lamelas. Essas alterações acarretaram aumento da espessura da lamela. Segundo Koca et al., (2005) lesões dessa natureza diminuem o espaço para a passagem da água, aumenta a distância da barreira água/sangue dificultando assim o consumo de oxigênio como resposta de defesa do animal.

A desorganização das lamelas, associada às lesões causadas pela exposição aguda à amônia constituem danos que certamente irão afetar o funcionamento normal do órgão, diminuindo a eficiência dos importantes mecanismos da brânquia para os peixes. Park et al. (2007) trabalharam com Bodião poleiro do mar ou Japanese red rockfish (*Sebastes inermis*) 83,3g e estimaram a CL₅₀ (96h) em 700 mg-L de N-NO₂. No presente estudo o valor da CL₅₀ (96h) para animais de 45 dias foi de 141,96 mg-L N-NO₂. Comparando os dois valores de CL₅₀ estimados, a diferença pode ser atribuída a uma espécie ser marinha e a outra de água doce. Yanbo et al. (2006) constataram que animais mantidos em maiores salinidades tendem a ter maior tolerância à toxicidade do nitrito. Concentrações elevadas de íons cloreto podem reduzir a toxicidade de nitrito, isso ocorre porque o nitrito e o íon cloreto competem pelo mesmo transportador nas células de cloreto das brânquias (Williams e Eddy, 1986).

Costa et al. (2008) estudaram a a CL₅₀ (96h) N-NO₂⁻ em diferentes salinidades para juvenis de pampo (*Trachinotus marginatus*) (0.86 ± 0.21 g). Os autores estimaram as CL₅₀-96h em 39,94; 116,68 e 37,55 mg-L N-NO₂⁻ para 5, 10 e 30‰, respectivamente. O valor da CL₅₀-96h para a enguia (*Anguilla anguilla*) foi estimado em 812 mg-L N-NO₂⁻ em água marinha (36‰) e 84 mg-L N-NO₂⁻ em água doce (Saroglia et al., 1981). Conforme o resultado alcançado pelos autores, a salinidade foi responsável pela maior tolerância dos animais quando expostos ao nitrito.

Park et al. (2007) também relataram alterações histopatológicas similares as encontradas no presentes estudo em Japanese red rockfish (*Sebastes inermis*), expostos a 700 mg/L NO₂⁻. Os autores observaram fusão lamelar, hiperplasia, necrose, aneurisma e desprendimento do epitélio lamelar. Lesões celulares podem ser desencadeadas pela ação de algum tóxico considerado como agente agressor. A severidade da lesão vai depender de

fatores como a intensidade, duração da agressão e o tipo celular. Esses fatores serão determinantes se inibida a ação do tóxico o órgão acometido irá se recuperar e voltar a normalidade (Bogliolo, 2009).

Os animais de 21 e 45 dias de vida expostos nas maiores concentrações de nitrito 175 mg-L N-NO₂ e 280 mg-L N-NO₂ respectivamente, além de apresentarem alterações como hiperplasia, fusão lamelar, desprendimento do epitélio, proliferação celular observadas pela histologia, apresentaram também dilatação de vasos sanguíneos nas células pavimentosas observadas por meio da microscopia eletrônica de varredura. Se o agente estressor permanecer em contato com o animal, ele pode levar à ruptura dos vasos sanguíneos e à formação de pequenos focos hemorrágicos (Jiraungkoorskul et al., 2002). Lesões como a dilatação dos vasos sanguíneos pode levar a danos como aneurisma e a ruptura do epitélio (Fernandes e Mazon).

As células pavimentosas são importantes na proteção contra alterações ambientais. Conforme a permanência e a intensidade do agressor no meio aquático, as células pavimentosas perdem seu contorno, chamado de cristas, podendo se romper causando hemorragia. Essa característica é um mecanismo de defesa para diminuir a contaminação pelo agente tóxico (Bernet et al., 1999)

Costa et al. (2008) estudaram a CL₅₀ (96h) N-NO₂ em diferentes salinidades para juvenis de pampo (*Trachinotus marginatus*) (0.86 ± 0.21 g). Os autores estimaram as CL's₅₀ (96h) em 39,94; 116,68 e 37,55 mg-L N- NO₂ para 5, 10 e 30‰ respectivamente. O valor da CL₅₀(96h) N-NO₂ para a enguia *Anguilla anguilla* foi estimado em 812 mg-L em água marinha (36‰) e 84 mg-L em água doce (Saroglia et al., 1981). Conforme o resultado alcançado pelos autores, a salinidade foi responsável pela maior tolerância dos animais quando expostos ao nitrito.

No referido estudo o valor da CL₅₀ para o *B. splendens* de 45 dias foi de 141,96 mg-L de N-NO₂. Costa et al. (2004) estimaram a CL₅₀-96h em 1,82 mg-L N-NO₂ para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) 65.7±3.0 g. Avilez et al. (2004) encontraram a CL₅₀-96h de 0,86 mg-L N-NO₂ em juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) 45,0 ± 11,85g. A tolerância das diferentes espécies quando expostas ao nitrito podem ter influência interespecífica, isso faz com que algumas espécies de peixes sejam mais sensíveis ao nitrito.

Os níveis de segurança para amônia e nitrito encontrados no referido estudo são espécie-específicas, ou seja, são limites estimados para a espécie *B. splendens* nas condições propostas durante o experimento de toxicidade aguda. Os valores encontrados não foram testados no estudo, mas revelam a importância de estimar limites de tolerância para as espécies nas diferentes condições de produção, considerando as interações da biologia dos

animais com as variações abióticas do meio. O conhecimento disponível sobre as muitas espécies de peixes produzidas comercialmente no mundo é ainda incipiente em relação aos limites de tolerância dos compostos nitrogenados, já que os sistemas de produção de peixe, nos diferentes regimes de exploração, estão implantados em todas as condições ecológicas possíveis. Assim sendo, os níveis de segurança para compostos nitrogenados devem ser investigados individualmente pelos produtores, em seus diferentes sistemas de produção aquícola considerando as variáveis limnológicas existentes.

A alta tolerância do *Betta splendens* à amônia ao nitrito e á condições de hipóxia podem ser atribuída a questões evolutivas, o beta é oriundo dos países asiáticos e encontrado naturalmente nas lâminas de água das plantações de arroz, que tem como característica águas estagnadas com baixo teor de oxigênio dissolvido e ricas em matéria orgânica. Tais características são favoráveis para produtores ornamentais. Os animais podem ser produzidos em águas com baixo teor de oxigênio dissolvido e necessitam de pouca renovação de água tornando esses peixes adaptados a condições que seriam extremamente indesejáveis para outras espécies. A altura da coluna de água também é importante em seu cultivo, já que o beta precisa buscar o ar atmosférico para respirar, se existir algum obstáculo que o impeça de subir à superfície para respirar o animal pode morrer, mesmo que exista oxigênio dissolvido em abundancia na água. Mesmo sendo tolerante aos compostos nitrogenados, estes não devem se acumular dentro do sistema, pois conforme relatado no trabalho os nitrogenados interferem no crescimento e desenvolvimento saudável da espécie, e das características ornamentais como corrosão das nadadeiras e coloração pálida, o que seria causa de elevados prejuízos para o produtor.

Os danos e lesões observadas no presente estudo demonstram efeitos adversos nas brânquias do *Betta splendens* expostos a crescentes concentrações de amônia e nitrito. Esses danos podem afetar o funcionamento normal das brânquias e resultar em mortalidade, redução no crescimento, desenvolvimento, reprodução e acarretar prejuízos dentro de um sistema de produção.

5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que o peixe ornamental *Betta splendens* é tolerante a altas concentrações de amônia e também de nitrito. Entretanto, os valores obtidos nesta pesquisa fornecem informações individuais do limite de toxicidade agudo para cada idade estudada, não pode ser utilizado como base para peixes de água doce

em geral, já que o limite de segurança dos compostos nitrogenados amônia e nitrito para cada espécie deverá ser estudado levando em consideração as condições do ambiente e a tolerância da espécie cultivada.

As análises histopatológicas e a microscopia eletrônica de varredura das brânquias foram essenciais para estimar as concentrações que podem afetar a integridade das lamelas e causar prejuízo econômico ao produtor. Além de se mostrar uma importante ferramenta para investigar biomarcadores de contaminação aquática.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos testes de toxicidade e as alterações histopatológicas identificadas nas brânquias dos peixes estudados indicam a necessidade de mais atenção para o estabelecimento de critérios para a qualidade da água. Os valores dos níveis de segurança encontrados no presente trabalho não devem ser utilizados para teleósteos em geral. A determinação dos limites de tolerância aos compostos nitrogenados deve ser investigada de acordo com a espécie trabalhada levando em consideração as condições ambientais. Futuros trabalhos deverão ser realizados para investigar de forma mais precisa os efeitos crônicos dos compostos nitrogenados no crescimento e desenvolvimento do peixe ornamental *Betta splendens*.

Agradecimentos

Laboratórios da Escola de Veterinária UFMG (saneamento ambiental, maricultura e de peixes ornamentais) *CAPES* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Segmento em ascensão. Disponível em: <http://abinpet.org.br/imprensa/noticias/segmento-em-ascensao/>. Acesso em: 10 jan 2016.
- ALCARAZ, G.; ESPINA, S. Scope for growth of juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella* exposed to nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.* v.116 C, p.85-88, 1997.
- ALMAZÁN-RUEDA, P.; VAN HELMOND, A.T.M.; VERRETH, J. A. J.; SCHRAMA, J.W. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. *J. Fish Biol.*, v.67, p.1029-1039, 2005.
- ARANA LV. Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura. Editora da UFSC. Florianópolis; 1997. p. 166.
- ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v.44, p.62-72, 1999.
- ARILLO, A.E.; GAINO, C.; MARGIOCCO, P.; MENSI, G. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. *Environ. Res.* v.34, p.135-154, 1984.
- ARTHUR, J. W.; W.W. CORLIS; ALLEN, K.N.; HEDTKE, S.F. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.38, p.324-331, 1987.
- AVILES, I.M.; ALTRAN, A.E.; AGUIAR, L.H.; MORAES, G. 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.139C, p.135-139, 2004.
- BALL I. The relative of some species of fresh-water fish to poisons II Ammonia. *Water Res.*, v.1, p.767-75, 1987.
- BARBIERI, E. DOI, S. A. Acute toxicity of ammonia on juvenile cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. *Aquaculture International*, v.20(2), p.373-382, 2011.
- BENLI, A.Ç.K.; KÖKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae e fingerlings. *Tur. J. Vet. Anim. Sci.*, v.29, p.339-344, 2005.
- BENLI, A.Ç.K., KÖKSAL, G., ÖZKUL, A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, v.72, p.1355-1358, 2008.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, v.22, p.25-34, 1999.
- BODANSKY O. Methaemoglobinaemia and methaemoglobin-producing compounds. *Pharmacol. Ver.*, v.3, p.144-196, 1951.
- BOGLIOLO, Luigi. Patologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BOUMENDJEL ME.; TAIBI F.; HOUHAMDI M.; ABBACI H. Reproduction et alevinage de *Betta splendens*. Département de Biologie, Université d'Annaba, Algérie. Disponível em <http://mahieddine.ifrance.com/betta.html>. Acesso 21/01/2017.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn: Alabama Agricultural Experiment Station: Auburn University, 1992. 183p.
- BRASILEIRO-FILHO, G.; BOGLIOLO, L. Patologia Geral. 4 ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2009. 378p.
- CARDOSO, R. S.; IGARASHI, M. A. Aspectos do agronegócio da produção de peixes ornamentais no Brasil e no Mundo. *PUBVET, Londrina*, v.3(14), p.563, 2009.

- CHEZHIAN, A.; SENTHAMILSELVAN, D.; KABILAN, N. Histological changes induced by ammonia and pH on the gills of fresh water fish *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linnaeus). *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, v.7, p.588-596, 2012.
- COSTA, L.D.F.; MIRANDA-FILHO, K.C.; SEVERO, M.P. et al. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. *Aquaculture*, v.285, p.270-272, 2008.
- CYRINO, J.E.P.; SAMPAIO DE OLIVEIRA, A.M.B.M.; COSTA, A.B. Curso – Introdução à Piscicultura. Disponível em <http://projetopacu.com.br/public/paginas/215-apostila-esalq-curso-atualizacao-em-piscicultura.pdf> Acessado em 18/01/ 2017.
- DAMAZIO, A. Criando o *Betta*. 2.ed. Rio de Janeiro: Inter-Revistas, 1992. 80p.
- DAS, P.C.; AYYPPAN, S.; JENA, J. K.; DAS, B. K. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham): Acute toxicity sub-lethal effect on select haematological parameters. *Aquaculture*, 235:633-644, 2004.
- DONALDSON, E. M. The pituitary-interrenal axis as indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Editor). *Stress and fish*. Academic Press, London, 1981. cap. 2, p. 11 – 47.
- EDDY, F. B.; KUNZLIK, P. A.; BATH, R. N. Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairneri* (RICHARDSON), and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in fresh water and dilute sea water. *J Fish Biol*, v.23, p.105-116, 1983.
- EDISON BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquac. Res.*, p.1–8, 2013.
- EMBRAPA. Práticas de Manejo (BPMs) para Reduzir o Acúmulo de Amônia em Viveiros de Aqüicultura: EMBRAPA comunicado técnico 44, 1999. 370p.
- EMERSON, K.R.E.; LUND, R.V.; THURSTON R.C.; RUSSO, R.C. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Board. Can.*, v.32, p. 2379-2383, 1975.
- EL-SHAFI, S.A.; EL-GOHARY, F.A.; NASR, F.A. et al. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.232, p.117-127, 2004.
- EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; POTTS, W.T.W. Ionic Transport in the Fish Gill Epithelium. *J. Exp. Zool.*, v.283, p.641– 652, 1999.
- EVANS, J.J.; PARK, D.J.; BRILL, G.C.; KLESIUS, P. H. Un-ionized Ammonia Exposure in Nile Tilapia: Toxicity, Stress Response, and Susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. *N. Am. Aquacult.*, v.68, p.23–33, 2006.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1996-2005. FAO Yearbooks 1996 to 2005, Fishery Statistics, Commodities. Volumes 83-97. FAO: Rome, Italy.
- FARIA, P.M.C.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P. et al. Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens*. *Rev. bras. Reprod.*, v.30, p.134-149, 2006.
- FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val., A. L., KAPOOR, B. G. (Eds.), *Fish Adaptations*. Science Publishers, Inc. Enfield, USA, 203–231, 2003.
- FISHBASE, 2010. Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (05/2010)..
- FRACÁCIO, R.; VERANI, N. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G. et al. Alterations on growth and gill morphology of Danio rerio (Pisces, Cyprinidae) exposed to the toxic sediments. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.46, n.4, p.685-695, 2003.
- GARCIA-SANTOS, S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES A.; WILSON JM. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure:

- Assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.*, v. 21, p.33-46, 2006.
- GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.2, p.376-381, 2007.
- GROSELL, M.; F.B. JENSEN. NO₂ uptake and HCO₃ excretion in the intestine of the European flounder (*Platichthys flesaus*). *J. Exp. Biol.*, v.202, p.2103–2110, 1999.
- HANDY, R.D. e POXTON, M.G. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Ver. Fish Biol. Fish*, v.3, p.205, 1993.
- HEATH A.G. (1987): Water Pollution and Fish Physiology. CRC Press, Inc., Florida, 1987. 272 pp.
- HILMY, A.M.; N.A. EL-DOMIATY.; K. WERSHANA. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 86C, p.247–253, 1987.
- HUET, M. Tratado de piscicultura. Madrid: MundiPrensa, 3 ed. p.615, 1983.
- HUANG, C.Y.; CHEN, J.C. Effects on acid-base balance, methemoglobinemia and nitrogen excretion of European eel after exposure to elevated ambient nitrite. *J. Fish Biol*, v.61 p.712–725, 2002.
- HUERTAS, M.; GISBERT. E.; RODRI´GUEZ, A.; CARDONA, P.L. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC50) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquat. Toxicol.*, v. 57, p.257–266, 2002.
- HUEY, D.W.; BEITINGER, T.L. Metahemoglobin levels in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, exposed to nitrite and tricaine methanesulphate *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v39, p.643–645, 1982.
- JENSEN F.B.; ANDERSEN N.A.; HEISLER N. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acidbase and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol.*, v.157, p.533– 541, 1987.
- JENSEN F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol A*, v. 135,p.9–24, 2003.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAMA, E.S.; KRUAETRACHUEA, M. et al. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*, v.28, p.121-127, 2002.
- KNUDSEN, P.K.; JENSEN. F.B. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinemia and potassium balance disturbances in carp. *Fish Physiol. Biochem.*, v.16, p.1–10, 1997.
- KOCA, Y.B.; KOCA,S.; GÜRCÜ,B. et al. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Peciformes) in the Çine stream (Aydin/Turkey) with determination of water pollution. *Environ. Toxicol.*, v.20, p.560-571, 2005.
- KROUPOVA,H.; SVOBODOVA, J.M. Nitrite influence on fish: a review *Vet. Med. Czech.*, v.50, p.461–471, 2005.
- KROUPOVA, H.; MACHOVA, J.; PIACKOVA, V.; FLAJSHANS, M. Nitrite intoxication of common carp (*Cyprinus carpio* L.) at different water temperatures. *Acta Vet. Brno.*, v.75, p.561–569, 2006.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. Parte I. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.8(45), p.36-41, 1998a.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. Parte II. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v. 8(46), p.36-41, 1998b.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. Parte III. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.8(47), p.36-43, 1998c.

- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção. Jundiaí: Edcopyright, 2000a. 289 p.
- KUBITZA, F. Tilápias: manejo nutricional e alimentar. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.10(60), p.15-22, 2000b.
- KUBITZA, F. Larvicultura de peixes nativos. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.13(77), p.47-56, 2003. 42
- KUBITZA, F. Sistemas de recirculação: sistemas fechados com tratamento e reuso de água. *Panorama da Aqüicultura*, v.16,(95), p.15-22, mai./jun. 2006.
- KUBITZA, F. O mar está prá peixe...prá peixe cultivado. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.17(100), p.14-23, 2007.
- LAPPIVAARA, J.; OIKARI, A. Altered challenge response in witefish subchronically exposed um areas polluted by bleached kraft mill effluents. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v.43, p.212-222, 1999.
- LIMA, A.O.; BERNARDINO, G.; PROENÇA, C.E.M. Agronegócio de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.11, p.14-24, 2001.
- LIMA, A.O. Aquicultura ornamental: O potencial de mercado para algumas espécies ornamentais: Formas alternativas de diversificação da produção na aquicultura brasileira. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.78, p.23-29, 2003.
- LIMA, A.O. Aquicultura ornamental. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v.14, n.83, p.58-59, 2004.
- LIN, C.W.; CHEN, T.Y. Probing the pore of CIC-0 by substituted cysteine accessibility method using methane thiosulfonate reagents. *J. Gen. Physiol.*, v.122, p.147-159, 2003.
- LUPI, C.; NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F.; SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. *Revista Fafibe on line*, n.3, 2007.
- MARCON, L.; MOUNTEER, A.H.; BAZZOLI, N.; BENJAMIN, L. A. Histological and Histometric Evaluation of the Liver in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae), Exposed to Different Concentrations of an Organochlorine Insecticide. *The Anat. Rec.*, v. 298, p.1754-1764, 2015a
- MARGIOCCO C.; ARILLO A.; MENSI P.; SHENONE G. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and haematological consequences. *Aquatic Toxicology*, v.3, p.261-270, 1983.
- MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C. Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2006. p.81-95.
- MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (Eds). Limnologia Fluvial: Um estudo do rio Mogi-Guaçu. Editora Rima, São Carlos, 2003, p.149-180.
- MIRANDA-FILHO, K.C.; PINHO, G.L.L.; WASIELESKY, W.J. et al. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.150C, p.377-382, 2009.
- MIRON, D.S.; BECKER A.G.; LORO, V.L.; BALDISSEROTTO, B. Waterborne ammonia and silver catfish, *Rhamdia quelen*: survival and growth. *Ciênc. Rural*, v.41, p.349-353, 2011.

- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI A. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.
- OLIVEIRA, S.S.; WASIELESKY JR. W.; BALLESTER, E.L.C.; ABREU, P.C. caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent in situ hybridization" (fish) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica*, p.3-45, 2006.
- OLIVEIRA, S.R.; YAMANE, R.T.B.S.; NUNES, E.S.S. et al. Tolerance to temperature, pH, ammonia and nitrite in cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, an amazonian ornamental fish. *Acta Amaz.*, v. 38(40), 2008.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guideline for the testing of chemicals: Acute oral toxicity – Fixed dose method. Paris: OECD, 1992. Guideline n. 420.
- OSTRENSKY, A.; BRUGGER, A.M. Studies on the viability of silverside *Odontesthes argentinensis* cultivations: acute toxicity of ammonia. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.44, p.413-414, 1992.
- PARISI, S. Cuidando do peixe Betta. Disponível em: http://www.webanimal.com.br/peixe/index2.asp?menu=peixe_betta1.htm. Acesso 20/01/2017.
- PARK, I.S.; LEE, J.; HUR, J-W. et al. Acute Toxicity and Sublethal Effects of Nitrite on Selected Hematological Parameters and Tissues in Dark-banded Rockfish, *Sebastes inermis*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.38,2007.
- PAULINO, M. G.; SOUZA N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v.80, p.6-13, 2012.
- PEREIRA, B.F.; CAETANO, F.H. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. *Micron.*, v.40, p.783-786, 2009.
- PILLAY, T.V.R.; KUTTY, M.N. 2005. Aquaculture, Principles and Practices, 2 Edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 630 p.
- PEDREIRA, M.M.; LUZ, R.K.; SANTOS, J.C.E.; SAMPAIO, E. V. Biofiltração da água e tipos de substrato na larvicultura do pacamã. *Pesq. Agropec.Bbras.*, v.44, n. 5, p.511-518,2009.
- PIEDRAS, S.R.N.; OLIVEIRA, J.L.R.; MORAES, P.R.R.; BAGER, A. Acute toxicity of unionized ammonia and nitrite in *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842) fingerlings. *Ciênc. Agrotec.*, v.30, p.1008-1012, 2006.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, 1994. cap. 30, p. 339-352.
- QUEIROZ, J.F.; BOEIRA, R.C. Práticas de Manejo (BPMs) para Reduzir o Acúmulo de Amônia em Viveiros de Aqüicultura. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, 2007. 5p. (EMBRAPA-MEIO AMBIENTE. Comunicado Técnico, 44).
- RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. 2nd ed. Rand, G. M., ed. Washington, 1995.

- RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, v.45, p.17–23, 2002.
- RIBEIRO, F.A.S.; CARVALHO JUNIOR, J.R.; FERNANDES, J.B.K.; NAKAYAMA, L. Cadeia Produtiva do Peixe Ornamental. *Panorama da Aquicultura*, v. 19(112), p.36-45, 2009.
- RIBEIRO, F.A.S. Panorama mundial do mercado de peixes ornamentais. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/108/Ornamentais108.asp> Acessado em 21/12/2016.
- ROSSONI, F.; FERREIRA, E.; ZUANON, J. A pesca e o conhecimento ecológico local dos pescadores de acará-disco (*Symphysodon aequifasciatus*, Pellegrin 1904: Cichlidae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçu-Purus, baixo rio Purus, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas*, v.9, n.1, p.109-128, 2014.
- ROUMIEH, R.; BARAKAT, A.; ABDELMEGUID, N.E. et al. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskal 1775). *Aquac. Res.*, v.44, p.1777-1790, 2012.
- RUFFIER, P.J.; BOYLE, W.C.; KLEINSCHMIDT, J.K. Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, v.53, p.367-377, 1981.
- RUSSO R.,K.; R. THURSTON.; EMERSON. K. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effects of pH, nitrite species, and anion species. *Sci. Invent.*, v. 8, p.387- 397, 1981.
- SAMPAIO, L.A.; MINILLO, A. Viabilidade do uso de larvas de peixe-rei *Odontesthes argentinensis* em testes de toxicidade: efeitos da salinidade e da temperatura sobre a toxicidade aguda da amônia. In: Espindola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C.; Oliveira-Neto, A. L. (Eds.). *Ecotox.: perspectivas para o século XXI*. São Carlos: UFSCar, 2000. p.545-553.
- SAMPAIO, L.A.; WASIELESKY, W.J.; MIRANDA-FILHO, K.C. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 68, p. 668-674, 2002.
- SÁNCHEZ, O.I.A.; MATSUMOTO, T. Hydrodynamic characterization and performance evaluation of an aerobic tree phase airlift fluidized bed reactor in a recirculation aquaculture system for Nile tilapia production. *Aquacult. Eng.*, v.47, p.16-26, 2012.
- SANTOS, S.G.; MONTEIRO, S.M; CARROLA, J; FERNANDES, FONTAINHAS. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59(2), 2007.
- SANTOS, D.M.S.; CRUZ, C.F.; PEREIRA, D P. et al. Qualidade Microbiológica da água e histopatologia de brânquias de peixes provenientes de pisciculturas do município de Itapecuru-Mirim-Maranhão. *Acta Sci Biol Sci.*, v.34(2), p.199-205, 2012.
- SANTOS, E.C.C.; TAKAHASHI, L.S.; SILVA, T.V.; RIGOBELLO, E.C. Diferentes Alimentos no Crescimento inicial do Acará- Bandeira (*Pterophyllum Scalare*). Dados . IV Simpósio de Ciências da UNESP – Dracena; V Encontro de Zootecnia – Unesp Dracena; Dracena, 09 a 11 de setembro de 2008. p.5.

- SAOUD, P.; NAAMANI, S.; GHANAWI, J.; NASSER, N. Effects of Acute and Chronic Nitrite Exposure on Rabbitfish *Siganus rivulatus* Growth, Hematological Parameters, and Gill Histology. *J. Aquac Res. Development*, p.5-6, 201
- SAROGLIA, M.G.; SCARANO, G.; TIBALDI, E. Acute toxicity of nitrite to sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and European eel (*Anguilla anguilla*). *J World Aquac Soc.*, v.12, p.121-126, 1981. SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Aquicultura no Brasil – Série de estudos mercadológicos. Disponível [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf). Acesso em: Janeiro/2017.
- SCHWAIGER J.; FERLING, H.; MALLOW, U. et al. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, v.68,p.141-150,2004.
- SECEX - SISTEMA DE ANÁLISE DE INFORMAÇÕES DO COMÉRCIO EXTERIOR – ALICEWEB. Disponível em: Acesso em Julho de 2010.
- SEPICI-DINÇEL, A.; CAGLAN, K.B.A.; SELVI, M.; et al. sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.72, p.1433- 1439, 2009.
- SMITH, V, H; TILMAN, G, D; NEKOLA, J, C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ Pollut.*, v. 100, p.179-196, 1999.73.
- SOUZA, M.S. Piscicultura Ornamental, *Revista Panorama da Aquicultura*, v.6, no.36, p.20-22, 1996.
- THOPHON, S.; KRUAATCHUE, M.; UPATHAM, E.S.; et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lateolabrax niloticus*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environm. Poll.*, v.121, p.307-320, 2003.
- VALENTI, W.C.; MALLASEN, M.; BARROS, H.P. Sistema de recirculação e rotina de manejo para larvicultura de camarões de água doce *Macrobrachium rosenbergii* em pequena escala. *Bol. Inst. Pesca*, v. 35(1), p.141 – 151, 2009.
- VAN DEN HEUVEL, M.R.; POWER, M.; RICHARDS, J. et al. Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca*) exposed to oil sands mining- associated water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.46, p.334-341,2000.
- VEDEL, N.E.; KORSGAARD, B.; JENSEN, F.B. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/glutamate concentrations. *Aquat. Toxicol.*, v.41, p.325–342, 1998.
- VERBEEK, P.; IWAMOTO T.; MURAKAMI, N. Differences in aggression between wildtype and domesticated fighting fish are context dependent. *Animal Behaviour*, v.73, n.73, p.75-83, 2007.
- VIDAL JUNIOR, M. Produção aquícola de peixes ornamentais. In: VII Seminário de Aves e Suínos e III Seminário de Aquicultura, Maricultura e Pesca. Belo Horizonte, MG, 2007.
- VINATEA, L. Aquicultura, evolução histórica. N.30 julho agosto 1995. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/Paginas/panorama.asp>. Acessado em 06/01/17.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The Stress Response in Fish. *Physiol Rev.*, v.77(3), p.591-620, 1997.
- WILLIAMS, E.M.; EDDY, F.B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol.[B]*, v.156, p.867-872, 1986.
- WOLFSHEIMER, G. The guide to owning Bettas. Neptune City: T.H.F. Publications, 2003. 63p.

YANBO, W.; WENJU, Z.; WEIFEN, L.; ZIRONG, X. Acute toxicity of nitrite to tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiol. Biochem.*, v.32, p.49-54, 2006.