

UNIVERSIDADE DE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EXCREÇÃO E TOXICIDADE AGUDA EM ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*) EM DIFERENTES SALINIDADES**

LARA SCHAYDER DE MEDEIROS

VILA VELHA
FEVEREIRO/2013

UNIVERSIDADE DE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EXCREÇÃO E TOXICIDADE AGUDA EM ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*) EM DIFERENTES SALINIDADES**

LARA SCHAYDER DE MEDEIROS

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção grau de Mestre em Ecologia.

VILA VELHA
FEVEREIRO/2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M488e Medeiros, Lara Schayder de.

Excreção e toxicidade aguda em robalo peva (*Centropomus parallelus*) em diferentes salinidades / Lara Schayder de Medeiros. – 2013.

46 f. : il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Piscicultura. 2. Robalo (Peixe). 3. Excreção. 4. Testes de toxicidade. I. Gomes, Levy de Carvalho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 639.30981

LARA SCHAYDER DE MEDEIROS

**EXCREÇÃO E TOXICIDADE AGUDA EM ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*) EM DIFERENTES SALINIDADES**

Dissertação apresentada a
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ecologia de
Ecossistemas, para a obtenção
grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013,

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto (UFSM)



Prof.ª. Dr.ª. Adriana Regina Chippari Gomes (UVV)



Prof. Dr. Levy de Carvalho Gomes (UVV) - Orientador

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o mundo pertence a quem se atreve, e a vida é MUITO pra ser insignificante"

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lígia M. Medeiros e Gilmar P. Schayder, por terem sempre me incentivado nos meus estudos e nas minhas decisões de melhorias pessoais e profissionais, pelo amor, carinho e compreensão.

Ao meu namorado, Eduardo O. V. Vasconcelos, por ser meu companheiro, meu amigo nas horas de dificuldades e alegria e por sempre me motivar e me apoiar nos momentos em que mais precisei e até mesmo ter colocado a “mão na massa” quando precisei.

Aos meus amigos do Laboratório de Ictiologia Aplicada (Felipe Domingues, Vinicius Baroni, Priscyla Pavione, Laila Medeiros e Larissa Simões) sem eles não conseguiria realizar este trabalho, pelas inúmeras vezes que quase “madruguei” no laboratório e eles estavam sempre comigo. A minha sempre amiga Maria Luiza, por ter me ajudado mesmo sem anos de prática. Aos outros amigos de laboratório que também me proporcionaram momentos de alegria e todos nós superamos juntos nossos momentos de dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Levy de Carvalho Gomes, por ter me proporcionado o crescimento profissional, pelos toques e ensinamentos importantes no desenvolvimento da pesquisa durante este período de mestrado.

A professora Adriana R. Chippari Gomes pelos auxílios durante a pesquisa e convivência dentro do Laboratório.

A todo o colegiado e corpo docente do Programa de Pós-Graduação strictu sensu em Ecologia de Ecossistemas da UVV pelos auxílios e inúmeros conhecimentos e trocas vivenciadas durante o mestrado.

Aos professores, técnicos que me ajudaram diretamente e indiretamente durante a realização dos experimentos e aos funcionários do Biopráticas –UVV.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos pelo projeto REPENSA.

Muito obrigado por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	10
Aquicultura no Brasil e no mundo.....	10
Impactos Ambientais da Piscicultura.....	10
Excreção de amônia em peixes de água salgada e água doce.....	11
Toxicidade da amônia no ambiente e no organismo.....	13
Salinidade e enzimas.....	14
Robalo e a Piscicultura Marinha.....	16
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	17
Hipótese.....	17
Objetivo.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
Animais experimentais.....	18
Experimento I - excreção de amônia de robalo-peva alimentado e em jejum em um dia.....	18
Experimento II – toxicidade aguda de três concentrações de amônia não-ionizada em robalo peva em diferentes salinidades.....	20
Atividade da anidrase carbonica.....	20
Atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST) e da Catalase (CAT).....	21
Análises histopatológicas.....	22
Cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH).....	22
Análise estatísticas.....	23
4.RESULTADOS.....	24
Experimento I.....	24
Parâmetros de qualidade de água e mortalidade.....	24
Experimento II.....	25
5. DISCUSSÃO.....	34
Experimento I.....	34

Experimento II.....	35
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Um modelo que ilustra a forma como as proteínas Rh - RHAG (nas membranas de eritrócitos), Rhbg (nas membranas basolaterais de células epiteliais branquiais), e Rhcg (na membrana apical de células epiteliais branquiais) - pode facilitar a excreção de amônia do sangue para a água através das brânquias em peixes de água doce.....13

Figura 2 - Um modelo que ilustra a forma como as proteínas Rh - Rhbg (nas membranas basolaterais de células epiteliais branquiais) e Rhcg (nas membranas apicais de células epiteliais branquiais) - pode facilitar a excreção de amônia do sangue para a água através das brânquias em peixes de água salgada.....13

Figura 3 - Excreção de amônia em robalo peva (*Centropomus parallelus*) em jejum (A) e alimentado (B) em diferentes salinidades.....25

Figura 4 - Atividade da enzima Catalase (CAT) em exemplares de *Centropomus parallelus* aos tratamentos de 0 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹ nas salinidades 0, 10, 20, 30 e 40 por um período de 96 h. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos (p < 0,05) e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as salinidades (p < 0,05).....28

Figura 5 - A atividade da GST no tratamento de 1mg/L⁻¹ NH₃ na salinidade 40 apresentou valores significativos (p < 0,05) quando comparados com os demais tratamentos. O tratamento 0,5 mg/L⁻¹ de NH₃ na salinidade 20, diferiu significativamente de todos os demais tratamentos.....29

Figura 6 - Histopatologia em brânquias encontradas em exemplares de *Centropomus parallelus* (A) Estrutura branquial normal; (B) Descolamento epitelial (C) Hipertrofia e proliferação de células-cloreto; (D) Fusão total das lamelas (E) Hiperplasia (F) Hipertrofia. Barra de escala = 10 µm. Coloração = Azul de Toluidina.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.....23

Tabela 2 - Parâmetros físico da água (média \pm SEM) durante o experimento de excreção de amônia dos peixes em jejum e alimentados em diferentes salinidades.....24

Tabela 3 – Parâmetros físico-químico da água do robalo peva (*Centropomus parallelus*) em três concentrações de NH₃ (0; 0,5 e 1) e cinco salinidade (0, 10, 20, 30 e 40).....27

Tabela 4 - Atividade da Anidrase Carbônica. Letras minúsculas em coluna indicam diferença significativa de uma mesma concentração de amônia nas diferentes salinidades. Letras maiúsculas em linha indicam diferença significativa das diferentes concentrações de amônia em uma determinada salinidade. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).....28

Tabela 5 - Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH₃ em diferentes salinidades por 96 h.....31

Tabela 6 - Mediana do Índice Alterações Histológicas das brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH₃ em diferentes salinidades por 96 h. Letras minúsculas em coluna indicam diferença significativa de uma mesma concentração de amônia nas diferentes salinidades. Letras maiúsculas em linha indicam diferença significativa das diferentes concentrações de amônia em uma determinada salinidade. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).....33

RESUMO

Medeiros, Lara Schayder de, Msc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2013. **Excreção e toxicidade aguda em robalo peva (*Centropomus parallelus*) em diferentes salinidades.** Orientador: Dr. Levy de Carvalho Gomes.

A piscicultura é uma atividade que pode causar modificações na qualidade da água. O excesso de amônia nos peixes pode perturbar a troca gasosa branquial e o metabolismo oxidativo causando danos branquiais. O objetivo deste trabalho foi medir a taxa de excreção de amônia em *Centropomus parallelus* e verificar a toxicidade aguda de amônia em diferentes concentrações (0, 0,5 e 1 mg NH₃/L) e em diferentes salinidades. A excreção tanto para o peixe alimentado como em jejum diminuiu exponencialmente com o aumento da salinidade. Hipertrofia e hiperplasia, foram as alterações predominantes na morfologia branquial dos peixes expostos à amônia. A atividade da GST no tratamento de 1mg/L NH₃ na salinidade 40 apresentou valores significativamente maiores quando comparados com os demais tratamentos. Nos valores obtidos na atividade da enzima catalase e anidrase carbônica não foram observadas diferenças significativas. Com os resultados obtidos no estudo, podemos concluir que os juvenis do *C. parallelus* são tolerantes às concentrações de amônia em diferentes salinidades.

PALAVRAS-CHAVE: Robalo peva; Excreção; Amônia; Salinidade; Histopatologia.

ABSTRACT

Medeiros, Lara Schayder of Msc., University Vila Velha - ES, February 2013.
Excretion and acute toxicity in fat snook (*Centropomus parallelus*) in different salinities. Advisor: Dr. Levy Gomes de Carvalho.

The installation of fish farms is an activity that cause changes in water quality. Excess ammonia in fish may disrupt gas exchange and oxidative metabolism causing gill damage. The objective of this study was to measure the rate of ammonia excretion in *Centropomus parallelus* and verify the acute toxicity of ammonia at different concentrations (0, 0,5 and 1 mg NH₃ / L) and at different salinities. The excretion for both the fed and fasted fish decreases exponentially with increasing salinity. Hypertrophy and hyperplasia, were the predominant changes in gill morphology of fish exposed to ammonia. The GST activity in the treatment of 1mg / L NH₃ at salinity 40 was significantly higher than the other. No significant differences were observed in the activities of carbonic anhydrase and catalase. The results allow concluding that juvenile *C. parallelus* are tolerant to ammonia at different salinities.

KEYWORDS: Fat snook; Excretion; Ammonia; Salinity; Histopathology

1. INTRODUÇÃO

Aquicultura no Brasil e no mundo

A produção mundial de pescado, tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura, atingiu aproximadamente 146 milhões de toneladas em 2009. O maior produtor em 2009 foi a China com aproximadamente 60,5 milhões de toneladas e o Brasil contribuiu com 1.240.813 t em 2009 (0,86%) da produção mundial de pescado. Nos últimos 40 anos, a aquicultura, que abrange as criações de peixes (piscicultura), camarões (carcinicultura), rãs (ranicultura), moluscos (malacocultura) e algas (algocultura), tem sido a principal responsável pela diminuição do déficit entre a demanda e a oferta de pescado no mercado mundial (Cavalli et al., 2011). As estatísticas da FAO (2010) indicam que, de 1970 a 2008, a participação da aquicultura na produção mundial de pescado passou de 3,9% para 36,9%. Entre os vários segmentos da aquicultura, a piscicultura marinha é um dos setores que apresentam as mais altas taxas de crescimento em todo o mundo, tendo se mantido acima de 10% ao ano no período de 1990 a 2008 (FAO, 2010). Segundo Sampaio (2000), não existe registro comercial de piscicultura marinha no Brasil, mas apresenta em fase de pesquisa, como o cultivo da tainha *Mugil planatus* no Instituto de Pesca de São Paulo e também verificou o desenvolvimento na produção alevinos de robalo *Centropomus parallelus* e de linguado *Paralichthys orbignianus* na Universidade Federal de Santa Catarina. A piscicultura marinha esta bem desenvolvida no sudeste Ásia, na costa do Mediterrâneo e nos Estados Unidos (Sampaio, 2000)

Impactos Ambientais da Piscicultura

A instalação de unidades de piscicultura, embora totalmente dependente da qualidade e quantidade de água, é uma atividade que causa modificações na qualidade da água. O impacto causado no ambiente varia de acordo com o sistema de cultivo utilizado e, certamente, com as características do corpo d'água que recebe o efluente (Pereira & Mercante, 2005). A manutenção da qualidade da água e o conhecimento dos limites de tolerância de uma espécie em relação à qualidade da água são requisitos indispensáveis

em qualquer sistema de criação, influenciando decisivamente o sucesso ou fracasso de atividade produtiva. A principal fonte de compostos nitrogenados incorporados à água, na piscicultura intensiva, é a alimentação (Cavero et al., 2004) e o acúmulo desses resíduos nitrogenados, tais como amônia, nitrito e ureia, é um dos fatores limitantes mais importantes em sistemas de cultura intensiva (Ostrensky & Wasielesky 1995).

Excreção de amônia em peixes de água salgada e doce

A amônia é o produto principal de excreção nitrogenada em teleósteos, onde representa de 60 à 80%, e é produzido a partir do catabolismo de proteína na dieta, principalmente no fígado, mas também pode ser produzida no músculo, rim e intestino (Arana, 1997; Wilkie, 1997; Hargreaves & Kucuk, 2001; Foss et al., 2004; Wu & Sun, 2006; Benli et al., 2008). A ureia é outro composto que é excretado, porém não é tóxica e em contato com a água é rapidamente hidrolisada para produzir amônia e dióxido de carbono (Arana, 1997).

A excreção de amônia e ureia pode ser usada como indicador de balanço de nitrogênio dos peixes (Altinok & Grizzle, 2004). Alguns peixes têm a capacidade de converter amônia para a ureia através do ciclo da ureia ornitina que é usada por várias espécies de peixes durante o desenvolvimento ou, sob certas condições ambientais, como a exposição em pH alcalino, para evitar problemas de acúmulo e toxicidade de amônia (Randall & Tsui, 2002). Com isso, peixes ósseos excretam mais amônia que ureia, o que é vantajoso energeticamente em relação à conversão de amônia em ureia (Altinok & Grizzle, 2004; Randall & Tsui, 2002).

Vertebrados expressam tipicamente quatro grupos de genes Rh: Rh30, RHAG, Rhbg, Rhcg, onde o papel do RHAG, Rhbg Rhcg é facilitar o transporte de amônia. O padrão geral na maioria dos estudos é que as proteínas transportadoras Rhbg ocorre nas membranas basolaterais enquanto que as proteínas Rhcg são expressos nas membranas apicais. A identificação do gene Rh nas brânquias para a respiração de animais aquáticos foi relatado primeiro por Weihrauch et al. (2009) No caranguejo *Carcinus maenas*. Antigamente pensava-se que haveria dois mecanismos de transporte de amônia: (1) difusão

facilitada do NH_3 , (2) eletroneutro NH_4^+/H^+ e (3) eletrogênica NH_4^+ transporte, porém ainda existem controvérsias entre os estudos. Wright e Wood (2009) propuseram que o fluxo de NH_3 que ocorre das hemácias para o plasma é facilitada por RHAG eritrocítica. Se RHAG está presente em células pilares que estão entre o espaço de sangue lamelar e o epitélio branquial, logo irá facilitar ainda mais o fluxo de NH_3 ao epitélio branquial. A amônia não ionizada então difunde através da membrana basolateral da brânquia via Rhbg e do outro lado da membrana apical da brânquia através Rhcg. Logo que o NH_3 entra na água pelo lado apical, combina-se com H^+ , que é bombeado a partir da célula de cloreto pela H^+ -ATPase e/ou por Na^+/H^+ , de modo a formar NH_4^+ (Weihrauch et al, 2009; Wright e Wood, 2009; Zimmer et al., 2012). Percebe-se que os dois primeiros transportadores também facilita a captação Na^+ , ligando este processo ao de excreção de amônia. A anidrase carbônica também faz parte do modelo, fornecendo H^+ intracelular de NHE e H^+ -ATPase através da hidratação de CO_2 intracelulares. Uma evidência adicional sugere que a Na^+/K^+ -ATPase também pode desempenhar um papel na excreção de amônia em algumas espécies substituindo NH_4^+ por K^+ , transportando através da membrana basolateral (Zimmer et al., 2012) (Figura 1). Em água salgada, a excreção branquial de amônia também é dependente de acidificação da camada limite, e há evidências de que o Na^+/K^+ -ATPase, também facilita transporte de amônia (Weihrauch et al, 2009; Zimmer et al., 2012) (Figura 2).

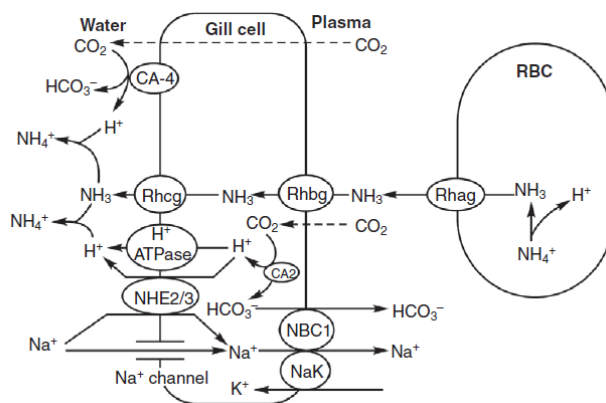


Figura 1: Modelo que ilustra a forma como a proteínas Rh - RHAG (nas membranas de eritrócitos), Rhbg (nas membranas basolaterais de células epiteliais branquiais), e Rhcg (no apical membranas de células epiteliais branquiais) - pode facilitar a excreção de amônia do sangue para a água através das brânquias em peixes de água doce (Fonte: Wright e Wood, 2009).

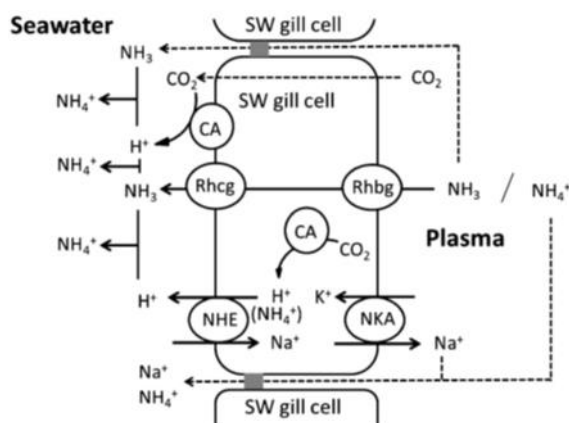


Figura 2: Modelo que ilustra a forma como a proteínas Rh - RHAG (nas membranas de eritrócitos), Rhbg (nas membranas basolaterais de células epiteliais branquiais), e Rhcg (no apical membranas de células epiteliais branquiais) - pode facilitar a excreção de amônia do sangue para a água através das brânquias em peixes marinhos. (Fonte Zimmer et al., 2012)

Toxicidade da amônia no ambiente e no organismo

A amônia é considerada um dos motivos mais comuns de mortalidade em piscicultura (El-Shafai et al., 2004; Benli et al., 2008; Le François et al., 2008). Elevados níveis de pH na água podem aumentar a concentração de NH_3 em relação ao NH_4^+ (Cavalli et al., 2000). A amônia não ionizada (NH_3) é de natureza lipofílica, ou seja, possui afinidade pelas

gorduras, difunde-se facilmente através das membranas respiratórias. Por outro lado, a amônia ionizada (NH_4^+), tem características lipofóbicas, penetrando menos rapidamente nas membranas (Arana, 1997; Cavalli et al., 2000; Benli et al., 2008). Portanto, se o nível de amônia aumentar na água, a excreção diminui, e os níveis de amônia no sangue e nos outros tecidos tendem a aumentar (Cavalli et al., 2000).

A toxicidade da amônia é principalmente atribuída a forma não-ionizada, que é afetada por parâmetros ambientais, tais como temperatura, alcalinidade, salinidade, nível de oxigênio e principalmente pelo pH (Ostrensky & Wasielesky 1995; Randall & Tsui 2002; Foss et al., 2004). A maioria das espécies de peixes não toleram altos níveis de amônia no ambiente, por isso, apresentam estratégias para evitar a toxicidade do composto como diminuir a excreção ou a conversão de amônia em outras substâncias menos tóxicas (Levi et al., 1974; Randall & Tsui 2002).

Os efeitos tóxicos de amônia provocam convulsões, falta de coordenação, interrupção do balanço iônico, aumento da vulnerabilidade a doenças e mudanças patológicas na estrutura branquial (Harris et al., 2001; Sinha et al., 2013). Entre outros efeitos, como o elevado nível de amônia no plasma em truta pode estar associado com o baixo desempenho de natação, diminuindo a capacidade anaeróbica (Harris et al., 2001). Com isso, o excesso de amônia nos peixes pode perturbar a troca gasosa branquial e o metabolismo oxidativo causando danos branquiais, produção excessiva de muco ou até mesmo afetar na capacidade de osmorregulação do organismo. (Wang et al., 2003; Le Fraçois et al., 2008; Chinga, et al., 2009; Hegazi et al., 2010). No nível ecológico, a carga de amônia alta nos corpos hídricos ou no sistema de pisciculturas pode contribuir para a eutrofização e acidificação do solo. Portanto, no longo prazo, pode-se especular que a poluição amoniacal pode dificultar a estabilidade do ecossistema aquático (Sinha et al., 2013).

Salinidade e enzimas

A salinidade é um dos parâmetros ambientais que mais influencia na sobrevivência, crescimento e distribuição de peixes (McCormick, 2001; Tsuzuki et al., 2007). Em teleósteos, a aclimatação em diferentes salinidades é

acompanhada por mudanças morfológicas e fisiológicas (Álvarez et al., 2005). Os movimentos migratórios para diferentes ambientes nos peixes eurialinos requer um mecanismo de controle osmótico ativo, onde são controlados principalmente pelas brânquias (Altinok et al., 1998; McCormick, 2001; Eddy, 2005). O epitélio branquial tem importante papel na manutenção osmótica e iônica dos peixes e as células que o constitui respondem, direta ou indiretamente aos fatores ambientais e a alterações internas do organismo (Lupi et al., 2007).

Em peixes, a anidrase carbônica, está presente no epitélio branquial e é considerada uma enzima multifuncional com diversos papéis fisiológicos, tais como: trocas gasosas, osmorregulação, excreção de compostos nitrogenados (amônia) e equilíbrio ácido-base. Esses processos estão relacionados e dependentes da reação reversível de hidratação do CO_2 , responsável pelo processo de formação de bicarbonato e hidrogênio (HCO_3^- e H^+), reação catalisada pela AC (Quabius et al., 1998; Henry, 1988).

A Glutathione S-transferase (GST) constitui um grupo de enzimas que têm a função de catalisar uma grande quantidade de xenobióticos e compostos endógenos do organismo, seja de forma direta ou catalisando metabólitos secundários. As GSTs atuam desempenhando um papel importante como enzimas desintoxicadoras do organismo (Gadagbui & James, 2000; Yu et al., 2007; Li et al., 2009; Ren et al., 2009; Ezemonye & Tongo, 2010). As GSTs são encontradas em animais vertebrados e invertebrados (insetos), fungos (levedura), organismos unicelulares (bactérias aeróbias) e vegetais (Yu et al., 2007). Para peixes cada família se divide nas seguintes classes GST-alfa (GSTA), GST-Mu (GSTM), GST-Pi (GSTP) e GST-Teta (GSTT) (Yu, et al., 2008).

A Catalase (CAT) é uma enzima oxiredutase, responsável por converter duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma molécula de oxigênio por meio de reações catalíticas (Ichise et al., 2008; Li et al., 2008; Gonçalves-Soares et al., 2012). A CAT trata-se de uma hemoproteína onipresente constituída por quatro subunidades ferritoporfirina (Kim et al., 2010; Gonçalves-Soares et al., 2012).

Robalo e a Aquicultura Marinha

Algumas espécies do gênero *Centropomus* têm sido reconhecidas como espécies com grande potencial para a aquicultura, devido à sua resistência a adversidades, bom crescimento, ao seu valor comercial e à alta frequência em que se encontram nos mercados devido à qualidade de sua carne (Tsuzuki et al., 2007). Devido a isto, as espécies deste gênero estão sendo intensamente capturada, diminuindo seu estoque no habitat (Borges et al., 2010). O *Centropomus parallelus* (robalo-peva) é um peixe eurialino nativo do Brasil, sendo encontrado naturalmente em ambientes marinhos, salobras e doces. Habitam a região costeira marinha, se reproduzem em estuários e na água doce e podem continuar o seu ciclo de vida nestes ambientes ou alternar entre os ambientes (Borges et al., 2010; Tsuzuki et al., 2007) O robalo-peva é um peixe de hábito alimentar carnívoro que preda principalmente peixes e crustáceos, podendo alcançar 5Kg além de ser um importante recurso alimentar para as populações locais (Cerqueira, 2010; Kirschbaum et al., 2009).

O robalo peva é um dos principais candidatos para o desenvolvimento da piscicultura em água salgada e salobra no Brasil. É a espécie que se tem maior conhecimento sobre reprodução em cativeiro (Cerqueira, 2010) e uma das únicas espécies nativas que é possível realizar a produção de juvenis em massa (Alvarez-Lajonchère et al., 2002).

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

HIPÓTESES

A medida que aumenta a salinidade, diminui a excreção de amônia em *C. parallelus*.

A toxicidade das concentrações de amônia é mais alta nos organismos expostos a água doce quando comparado com organismos expostos à água salgada.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi medir a taxa de excreção de amônia em *C. parallelus* e verificar a toxicidade aguda de amônia em diferentes concentrações (0, 0,5 e 1 mg de NH_3/L) e em diferentes salinidades.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos foram realizados dois experimentos, ambos com cinco salinidades (0, 10, 20, 30 e 40) onde o primeiro experimento avaliou a taxa de excreção de amônia de robalo peva alimentado e em jejum por um dia. O segundo experimento verificou os efeitos de três concentrações de amônia não-ionizada no metabolismo oxidativo e nos danos histopatológicos.

Animais experimentais

Os peixes ($5,84 \pm 0,162$ g de peso e $9,02 \pm 0,125$ cm de comprimento total) foram adquiridos em uma piscicultura particular de Linhares – ES e transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada, localizada na Universidade de Vila Velha (UVV). Os animais foram divididos e aclimatados em cinco aquários de 25 litros, salinidade 35 e aeração constante (N=18). A cada 24 horas foi feita a dessalinização ou a adição de sal artificial até que chegassem nas respectivas salinidades de 0, 10, 20, 30 e 40 para dar andamento no experimento. Feito isso, os animais foram aclimatados nas respectivas salinidades por 20 dias onde a água era totalmente trocada duas vezes por semana, com alimentação três vezes por dia e aeração constante.

Experimento I – excreção de amônia em robalo-peva alimentado e em jejum.

Para realizar o experimento de excreção de amônia os peixes foram anestesiados com uma solução de 0,1 g/L de benzocaína, pesados e transferidos para aquários com 3 litros de água com sua respectiva salinidade, totalizando 40 aquários de 3 litros com 2 peixes cada (n=8 para cada salinidade), com aeração constante. Foi realizada a média da biomassa de cada aquário, então os animais foram alimentados com ração comercial à 1% da biomassa. Os animais foram aclimatados nessas condições por 1 mês.

Após o período de aclimação, os peixes ficaram em jejum por 48 horas. Após o período de jejum, os peixes foram transferidos para um aquário

limpo na mesma salinidade e o experimento foi iniciado. O mesmo experimento foi repetido uma semana depois, com os mesmo peixes para confirmar os resultados obtidos no primeiro experimento.

Após o período de aclimação, os peixes ficaram em jejum por 48 horas. Após o período de jejum, os peixes foram transferidos para aquários limpos nas respectivas salinidades e em seguida foram alimentados com 2% da biomassa e observada a alimentação efetiva a fim de avaliar a excreção do peixe após a alimentação. O mesmo experimento foi repetido uma semana depois, com os mesmo peixes para confirmar os resultados obtidos no primeiro experimento.

Para cada experimento de excreção foi feito o controle positivo e negativo, sem peixe, para cada salinidade, onde o controle positivo teve adição de 0,0114 g de cloreto de amônio, o que correspondia a 1 mg/L NH₄. Para avaliar a excreção, foi retirada uma amostra de água no início e outra no final do experimento (24h). Durante o experimento de excreção, os animais não foram alimentados. No início e no final do experimento foram medidos temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade e pH de cada aquário.

A amônia da água foi quantificada utilizando o método do endofenol e medido por um espectrofotômetro da marca Biospectro SP – 220 em 640 nm de acordo com o APHA (1998).

A excreção total foi calculada a partir da fórmula segundo Altinok & Grizzle, 2004:

$$\text{Excreção total} = \{[(\text{NH}_f - \text{NH}_i) / g_{\text{total}}] / L\}$$

Onde NH_f corresponde a amostra calculada de amônia final, NH_i corresponde a amônia inicial, que foi dividido pela média da biomassa do aquário e por último dividido por 3, que corresponde a quantidade de água dentro de cada aquário (L).

A relação entre a excreção de amônia e a salinidade foi estimada a partir uma regressão exponencial. As regressões foram realizadas utilizando o software Sigma Stat 3.5.

Experimento II – toxicidade aguda de amônia não-ionizada em robalo peva em diferentes salinidades

Foi realizado um experimento fatorial com 3 concentrações de amônia (0, 0,5 e 1 mg NH₃/L e 5 salinidades (0, 10, 20, 30 e 40), totalizando 15 tratamentos (6 repetições para cada tratamento). A duração do experimento foi de 96h. Os animais não foram alimentados durante o período experimental para não aumentar a concentração de amônia no ambiente. A temperatura, condutividade, salinidade e pH foram monitorados a cada 24 horas. Foram realizadas coletas diárias de água do experimento para mensurar a concentração de NH₃. Para calcular a concentração de o NH₃ para cada tratamento, foi levado em consideração a temperatura, salinidade e pH da água e utilizada a seguinte formula (Barbieri & Doi, 2012):

$$\text{NH}_3 = \text{valor de NH}_4 / 1 + 10^{(\text{Pk} + 0,0324 * (298 - \text{Temp.K}) + 0,0415 * (1/\text{Temp.K}) - \text{pH})}$$

No final do período de 96 horas, os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína 0,1 g/L e posteriormente foram sacrificados por secção cervical (Nickum et al., 2004) para retirar as brânquias e o fígado.

Atividade da anidrase carbônica

A atividade da anidrase carbônica branquial foi determinada segundo método estabelecido por Vitale et al. (1999). As brânquias foram retiradas e mantidas no freezer -80°. O método consiste na quantificação da atividade desta enzima através de um meio de reação que conterà manitol (225 µL), sacarose (75 µL) e tris-fosfato (10 µL), pH 7,4.

As amostras foram homogeneizadas utilizando o próprio meio de reação. Para a quantificação, foi pipetado 7,5 µL do meio de reação e acrescentados 0,05 mL do sobrenadante do homogeneizado tecidual e 1 mL de água destilada saturada com CO₂ a 25°C. A queda do pH foi medida durante 20s através do pHmêtro de bancada. Uma reta de regressão linear do pH x tempo foi estabelecida, onde a inclinação da reta corresponderá à taxa de reação catalizada (TC). A taxa de reação não catalizada (TNC) foi medida da mesma forma e no mesmo tempo, porém, no lugar da amostra foram adicionadas 0,05 ml do tampão no qual a amostra foi diluída inicialmente.

A quantificação de proteínas totais nos extratos foi realizada de acordo com método de Lowry et al. (1951). O princípio do método é a redução que o reagente Folin-Ciocalteu sofre quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre, e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Para calcular a atividade da anidrase carbônica (AAC) foi utilizada a fórmula:

$$\text{AAC} = [\text{TC}/\text{TNC}-1]/\text{mg proteína total}$$

Atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST) e da Catalase (CAT)

O fígado dos animais foram descongelados e homogeneizados com tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugados (13.000g / RPS) por 30 min a 4°C, obtendo o sobrenadante utilizado para Glutathione S-transferase (GST) e Catalase (CAT). A atividade enzimática da GST foi determinada utilizando o método descrito por Habig et al. (1974); Habig e Jakoby (1981) utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340 nm, em um espectrofotômetro BioSpectro. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN.

A catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 240 nm (Aebi, 1984). Para tanto, foi usado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio 10 mM e tampão TE (Tris HCL 1M e EDTA 5 mM), sendo as amostras diluídas 100x no tampão TE. Para leitura, 10 µl de homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 990 µl de tampão de reação, misturadas por inversão e lidas em 240 nm em um espectrofotômetro BioSpectro.

A quantificação de proteínas totais nos extratos foi realizada de acordo com método de Lowry et al. (1951). O princípio do método é a redução que o reagente Folin-Ciocalteu sofre quando reage com proteínas, na

presença do catalisador cobre, e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Análises histopatológicas

Para a observação de possíveis histopatologias branquiais as amostras das brânquias coletadas e fixadas em ácido pícrico 4%. Posteriormente foram desidratadas em bateria crescente de álcoois (70-95%) em 1 minuto cada e incluídas em parafina. Cortes não seriados de 4 µm de espessura foram realizados para a confecção das lâminas, os quais foram corados com Azul de Toluidina e posteriormente analisados em microscópio de luz. As lâminas foram finalizadas utilizando óleo de Entellan. A ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias foi avaliada semi quantitativamente utilizando:

Calculo do Índice de Alteração Histológica (IAH)

O IAH foi calculado de acordo com a frequência e severidade de cada alteração histológica (lesão). As lesões foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento da função tecidual (Tabela 2), segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e modificada por Silva (2004). Esses dados foram utilizados para os cálculos de IAH através da seguinte fórmula:

$$IAH = 10^0 \cdot \sum I + 10^1 \cdot \sum II + 10^2 \cdot \sum III$$

Onde $\sum I$, $\sum II$ e $\sum III$ correspondem ao número total de alterações em cada estágio, e 10^0 , 10^1 e 10^2 são fatores para o cálculo do IAH, segundo a severidade da lesão.

Tabela 1: Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.

Estágios		
I	II	III
Hipertrofia do epitélio lamelar	Fusão total das lamelas	Necrose
Hiperplasia do epitélio lamelar	Aneurisma lamelar	
Congestão vascular	Ruptura epitelial	
Dilatação do canal marginal		
Descolamento epitelial		
Constrição do sistema de células pilares		
Proliferação de células-cloreto		
Proliferação de células mucosas		
Fusão parcial das lamelas		
Edema		

Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam um funcionamento normal do órgão; de 11 a 20 indicam danos leves a moderados no órgão; entre 21 e 50 indicam danos moderados a severos e os valores acima de 100 danos irreparáveis no tecido. As lâminas foram analisadas com o software Motic Image Plus 2.0 em microscópio de luz Leica.

Análise estatística

Os dados foram testados para normalidade. A Anidrase carbônica e o IAH foram analisados por uma Kruskal-Wallis ANOVA seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). A Catalase e a GST foram analisadas por uma ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

EXPERIMENTO I

Parâmetros de qualidade de água e mortalidade

Os valores médios das variáveis de qualidade da água durante o experimento de excreção de amônia em peixes em jejum e alimentados estão descritos na Tabela 2. O oxigênio dissolvido se manteve com os valores próximo de 7 mg/L em todos as salinidades e a temperatura foi uniforme com variação de apenas 0,1°C entre as salinidades. O pH foi mais alto nas duas maiores salinidades, mas a variação em relação as menores salinidades foi de apenas 0,3 unidades. A condutividade aumentou com o aumento da salinidade, variando de 0,08 mS/cm na salinidade 0 a 58 mS/cm na salinidade 40.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos da água (média \pm SEM) durante a excreção de amônia em *Centropomus parallelus* em jejum e alimentado e em diferentes salinidades.

Parâmetro	Salinidade				
	0	10	20	30	40
Jejum					
OD (mg/L)	7,7 \pm 0,24	7,3 \pm 0,05	7,3 \pm 0,08	7,3 \pm 0,04	7,1 \pm 0,1
Temp. (°C)	24,1 \pm 0,1	24,0 \pm 0,10	24,0 \pm 0,09	24,1 \pm 0,08	24,0 \pm 0,1
pH (unidade)	7,8 \pm 0,06	7,8 \pm 0,10	7,8 \pm 0,05	7,9 \pm 0,04	8,1 \pm 0,1
Cond. (mS/cm)	0,08 \pm 0,01	16,9 \pm 0,25	31,4 \pm 0,33	45,1 \pm 0,46	58,0 \pm 0,62
Alimentado					
OD (mg/L)	6,77 \pm 0,2	7,42 \pm 0,1	7,27 \pm 0,12	7,19 \pm 0,2	7,08 \pm 0,3
Temp. (°C)	24,5 \pm 0,1	24,5 \pm 0,08	24,6 \pm 0,1	24,6 \pm 0,1	24,5 \pm 0,1
pH (unidade)	7,78 \pm 0,1	7,78 \pm 0,05	7,79 \pm 0,1	7,79 \pm 0,1	7,86 \pm 0,3
Cond. (mS/cm)	0,11 \pm 0,01	16,6 \pm 0,06	31,2 \pm 1,62	44,88 \pm 0,24	57,45 \pm 2,52

A excreção de amônia em *C. parallelus* seguiu uma relação exponencial tanto com o peixe em jejum como com o peixe alimentado (Figura 3A e 3B). A taxa de excreção média de amônia na salinidade 0 foi de cerca de 23 µg/g dia em peixes em jejum e de 46 µg/g dia quando alimentado. Na salinidade 40 taxa de excreção média de amônia na salinidade foi de cerca de 11 µg/g dia em peixes em jejum e de 32 µg/g/dia. A razão entre a excreção de amônia em peixes jejum e alimentado foi de 1,96; 1,90; 2,57; 2,80 e 2,76, para os peixes aclimatados nas salinidades 0, 10, 20, 30, 40 e 50, respectivamente.

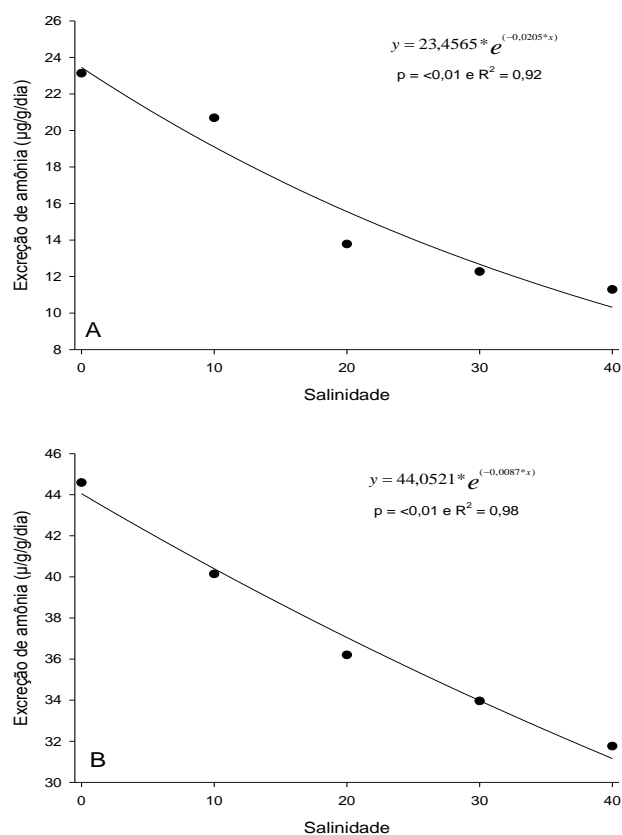


Figura 3: Excreção de amônia em robalo peva (*Centropomus parallelus*) em jejum (A) e alimentado (B) e em diferentes salinidades.

EXPERIMENTO II

Durante a realização do experimento, não houve mortalidade dos animais. Os resultados das variáveis de qualidade da água estão apresentados na tabela 3. A temperatura média durante o experimento foi de 25,5°C em

todos os tratamentos. As concentrações de amônia não ionizada ficaram próximas às concentrações nominais adicionadas aos aquários. A concentração de amônia total que apresentou uma marcante variação, sendo sempre superior na água doce quando comparado às demais salinidades. O pH de forma geral apresentou um valor crescente com o aumento da salinidade, entretanto, essa diferença foi inferior 1 unidade de pH. A variação do pH foi de 7,5 para a salinidade 0 e 8,1 para a salinidade 40. Da mesma forma que para o pH a condutividade elétrica da água aumentou com o incremento da salinidade.

Tabela 3 - Parâmetros físico-químico da água do robalo peva (*Centropomus parallelus*) em três concentrações de NH₃ (0; 0,5 e 1) e cinco salinidade (0, 10, 20, 30 e 40).

NH ₃ (mg/L)	Salinidade				
	0	10	20	30	40
Temperatura (°C)					
0,0	25,3±0,13	25,4±0,13	25,4±0,13	25,4±0,13	25,4±0,13
0,5	25,4±0,13	25,3±0,13	25,3±0,13	25,3±0,13	25,4±0,13
1,0	25,4±0,13	25,4±0,13	25,4±0,13	25,4±0,13	25,4±0,13
Amônia não ionizada (mg/L)					
0,0	0,20±0,04	0,20±0,04	0,10±0,02	0,20±0,04	0,20±0,02
0,5	0,70±0,04	0,48±0,04	0,40±0,06	0,40±0,06	0,40±0,04
1,0	1,20±0,06	0,76±0,06	0,90±0,07	0,90±0,07	0,70±0,07
Amônia Total (mg/L)					
0,0	3,7±0,54	3,0±0,60	2,7±0,34	3,0±0,57	3,0±0,33
0,5	11,5±0,67	7,3±0,59	7,0±0,92	6,9±0,81	7,0±0,62
1,0	17,8±0,89	11,5±0,87	13,6±1,10	13,9±0,98	11,4±1,01
pH (unidades)					
0,0	7,9±0,04	7,9±0,03	8,0±0,04	8,1±0,006	8,1±0,004
0,5	7,8±0,05	7,9±0,03	7,9±0,04	8,0±0,02	8,1±0,01
1,0	7,8±0,05	7,8±0,05	7,9±0,04	8,0±0,03	8,1±0,02
Condutividade (mS/cm)					
0,0	0,17±0,012	18,38±0,136	32,64±0,206	47,39±0,253	57,7±2,329
0,5	0,20±0,008	18,19±0,119	33,20±0,223	47,29±0,225	57,9±2,357
1,0	0,26±0,010	18,01±0,104	33,27±0,213	47,23±0,220	58,0±2,362

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nas diferentes salinidades bem como entre os tratamentos na mesma salinidade para as enzimas Catalase (Figura 4) e Anidrase Carbônica (Tabela 4).

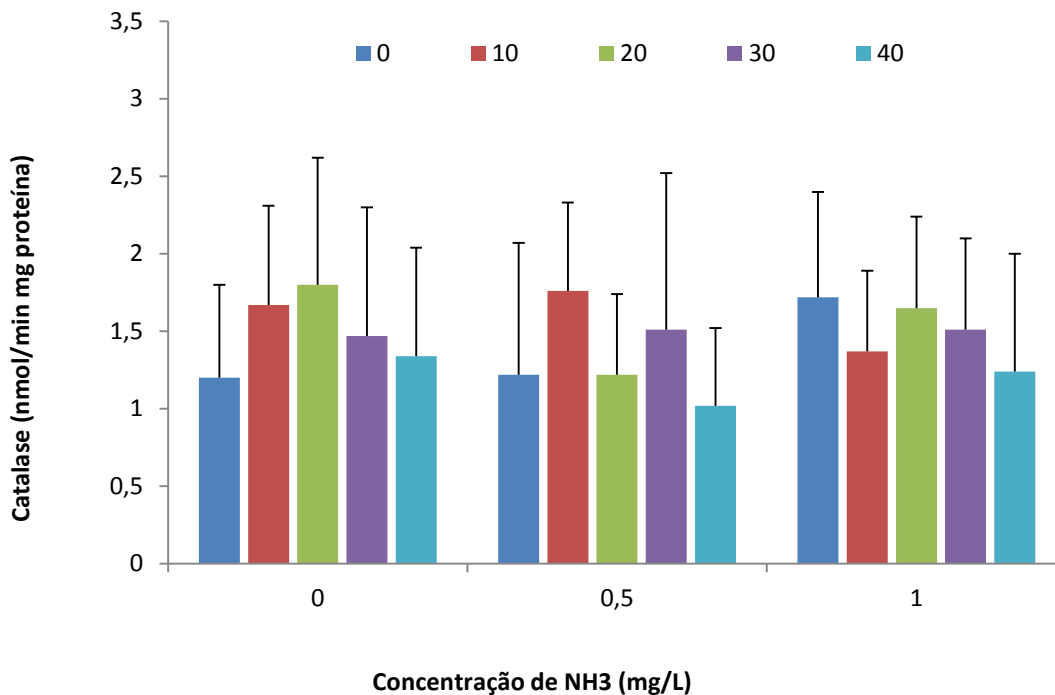


Figura 4: Atividade da enzima Catalase (CAT) em exemplares de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH_3 em diferentes salinidades por 96 h. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4: Atividade da Anidrase Carbônica (mg proteína^{-1}) em *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH_3 em diferentes salinidades por 96 h. Letras minúsculas em coluna indicam diferença significativa de uma mesma concentração de amônia nas diferentes salinidades. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Salinidade	Amônia não ionizada (mg/L)		
	0	0,5	1
0	0,558	0,339	0,122
10	0,398	0,272	0,132
20	0,354	0,149	0,125
30	0,358	0,204	0,226
40	0,299	0,153	0,213

A atividade da GST na salinidade 40 no tratamento de 1mg/L NH₃ apresentou valores significativos ($p < 0,05$) quando comparados com os demais tratamentos na mesma salinidade. O tratamento 0,5 mg/L⁻¹ de NH₃ na salinidade 20, diferiu significativamente de todos os demais tratamentos (Figura 5).

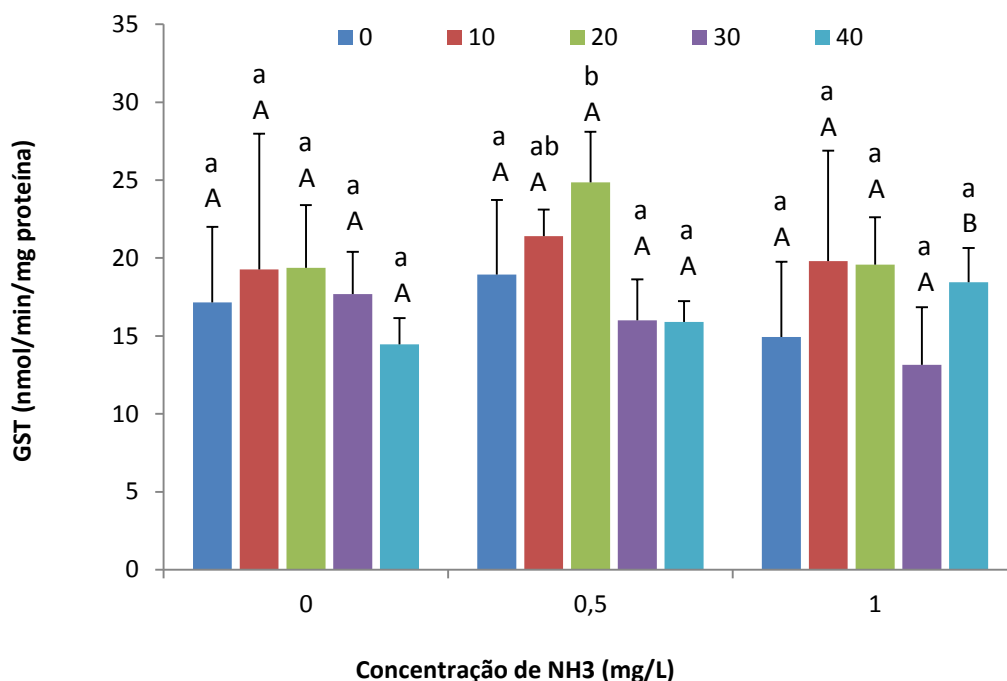


Figura 5: Atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) em *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH₃ em diferentes salinidades por 96 h. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as salinidades. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

As alterações histopatológicas branquiais decorrentes da exposição aguda a concentrações de amônia foram basicamente as mesmas para os diferentes tratamentos. Hipertrofia e hiperplasia, foram as alterações predominantes na morfologia branquial dos peixes expostos à amônia em todos os tratamentos quando expostos a 96 horas, mas principalmente na salinidade 0. Em menor proporção alguns tratamentos, apresentaram fusão total das lamelas, principalmente no tratamento de 1mg/L de NH₃ na salinidade 30 (Tabela 5). A estrutura normal do epitélio lamelar e as principais

histopatologias encontradas em brânquias de robalo-peva estão apresentadas na figura 6.

Tabela 5: Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH₃ em diferentes salinidades por 96 h.

Alteração	Estágio	Salinidade 0			Salinidade 10			Salinidade 20			Salinidade 30			Salinidade 40		
		Concentração de amônia não ionizada (mg/L)														
		0	0,5	1,0	0	0,5	1,0	0	0,5	1,0	0	0,5	1,0	0	0,5	1,0
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+++	+++	+++	0+	++	++	0+	+	+	0+	0+	+++	++	++	+
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilatação capilar	I	0+	0	0+	0+	0+	+	0+	+	+	0+	0+	0+	+	+	+
Descolamento epitelial	I	++	++	++	++	++	++	0+	0+	++	0+	+	++	+	++	++
Proliferação de células cloreto	I	++	+++	+++	+	++	++	0+	++	++	0+	++	++	++	++	+++
Proliferação de células mucosas	I	+	++	0+	0+	0+	+	0	0	0+	++	0+	++	0	0+	+
Congestão	I	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0+	0	0	0	0	0
Fusão parcial das lamelas	I	+	+	0	0	0+	0+	0	0	0	0+	0+	0+	0+	0	0
Constricção do sistema de células	I	0+	0	0	0	0	0	0	0	0	0+	0	0	0	0	0
Fusão total das lamelas	II	++	0	0	0+	+	0+	0	0	+	0+	+	++	+	++	++

0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente.

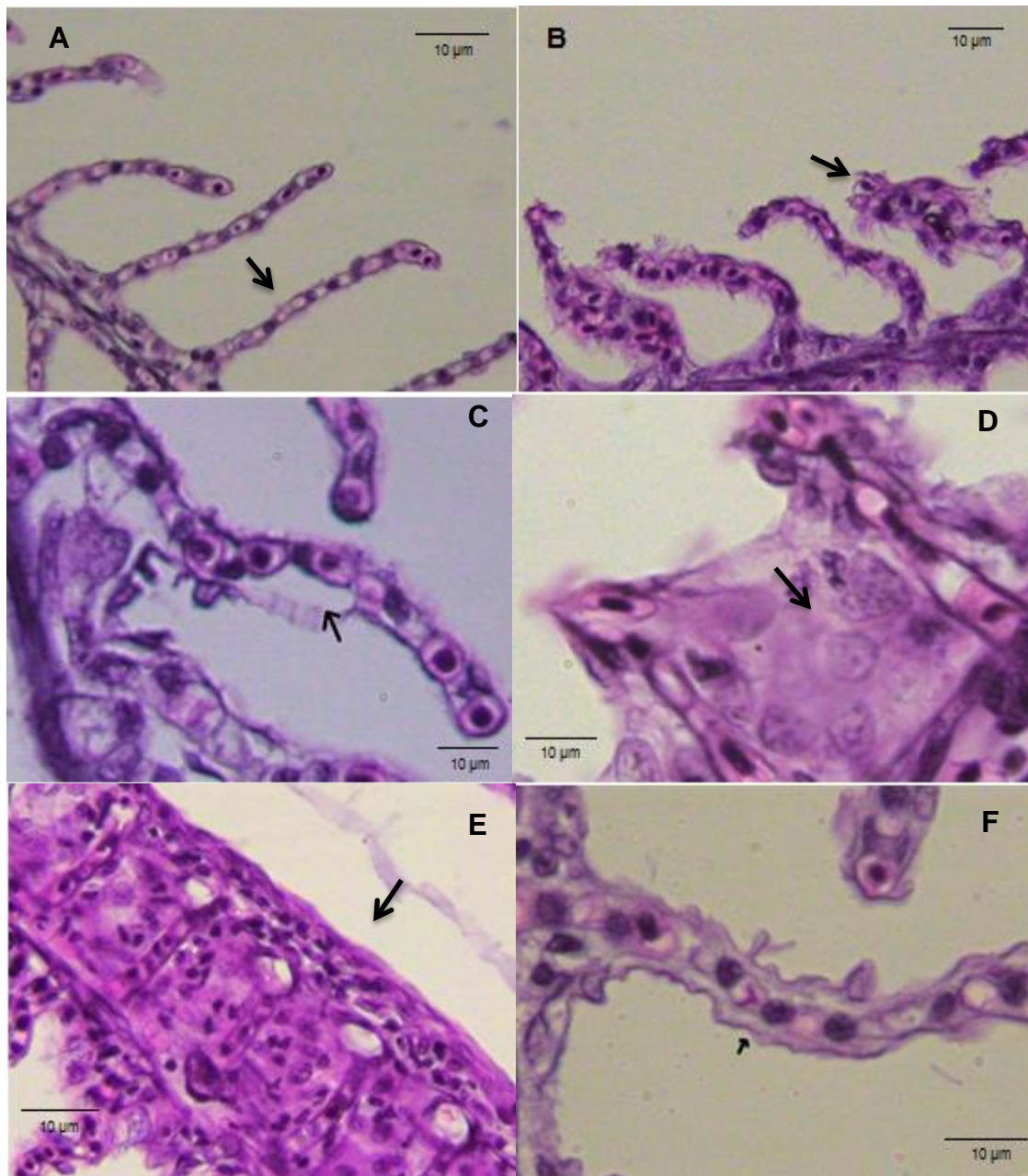


Figura 6: Histopatologia encontradas nas brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH_3 em diferentes salinidades por 96 h. (A) Estrutura branquial normal na salinidade 10 sem contração de amônia; (B) Hipertrofia na salinidade 0 na concentração de 0,5 mg/L de NH_3 (C) Descolamento epitelial na salinidade 0 na concentração de 1 mg/L de NH_3 (D) Hipertrofia e proliferação de células-cloreto na salinidade 40 na concentração de 1 mg/L de NH_3 (E) Fusão das lamelas na salinidade 30 na concentração de 1 mg/L de NH_3 (F) Hiperplasia na salinidade 20 na concentração de 0,5 mg/L de NH_3 . Barra de escala = 10 μm . Coloração = Azul de Toluidina.

O IAH foi significativamente mais alto nos peixes da salinidade 30 quando expostos a 1 mg/L de amônia não ionizada quando comparado aos peixes expostos no tratamento sem adição de amônia. O IAH na salinidade 30

na concentração de 1mg/L de NH₃ apresentou uma diferença significativa quando comparada no mesmo tratamento porém em diferentes salinidade (Tabela 6). Os peixes expostos a 0,5 mg/L de amônia não ionizada não diferiram de nenhum outro tratamento. Houve um aumento significativo do IAH com o aumento da concentração de amônia nas salinidades 20 e 30.

Tabela 6: Mediana do Índice Alterações Histológicas das brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de NH₃ em diferentes salinidades por 96 h. Letras minúsculas em coluna indicam diferença significativa de uma mesma concentração de amônia nas diferentes salinidades. Letras maiúsculas em linha indicam diferença significativa das diferentes concentrações de amônia em uma determinada salinidade. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey (p<0,05).

Salinidade	Amônia não ionizada (mg/L)		
	0	0,5	1
0	4 ^a A	5 ^a A	5 ^a A
10	3 ^a A	4 ^a A	5 ^a A
20	3 ^a A	4 ^a AB	5 ^a B
30	4 ^a A	5 ^a AB	14 ^b B
40	6 ^a A	5 ^a A	6 ^{ab} A

5. DISCUSSÃO

EXPERIMENTO I

No presente estudo, a salinidade influenciou exponencialmente a taxa de excreção de amônia de *C. parallelus*. A maior taxa de excreção foi encontrada na salinidade 0 para os peixes em jejum ou alimentado. Entretanto, a partir da salinidade 20 nota-se igualdade nas taxas de excreção. O mesmo resultado foi obtido por Altinoka & Grizzle (2004) para as espécies de peixes eurialinos (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Morone saxatilis* e *Acipenser oxyrinchus desotoi*) e Wu & Sun (2006) com *Procephalothrix simulus* onde a excreção diminuiu com o aumento da salinidade. Rocha et al. (2005), observaram taxas de excreção maiores em *C. parallelus* expostos a salinidade 5 quando comparado a salinidade 30. De acordo com Frick e Wright (2002) a redução da excreção de compostos nitrogenados com o aumento da salinidade é uma consequência da redução do catabolismo e da retenção de aminoácidos. Em função do resultado obtido no presente estudo, provavelmente, esse mesmo processo metabólico ocorre no *C. parallelus* até a salinidade 20, pois a partir daí não se nota mais uma diminuição na taxa de excreção de amônia, o mesmo foi observado por Frick e Wright para o *Rivulus marmoratus* em salinidades superiores a 30.

No estudo de Richly & Marina (1977), a excreção de amônia de *Salmo gairdneri* aumentou duas vezes quando os peixes foram alimentados quando comparados com os animais em jejum. Nesse estudo, essa razão a excreção de amônia entre peixes alimentados e em jejum foi maior para os peixes em água salgada (2,5-2,8 vezes) e menor para os peixes em água doce e com salinidade 10 (1,6-1,9 vezes), sendo similares as razões obtidas pelo autor supracitado. Esse resultado é diferente ao obtido na excreção, onde as maiores taxas de excreção são observadas nos peixes nas salinidades 0 e 10, mas por outro lado, nessas mesmas salinidades observa-se uma menor razão na excreção entre os peixes alimentados e em jejum.

O *C. parallelus* por ser um peixe eurialino suporta elevado gradiente de salinidade o que permite que a sua criação seja realizada em diferentes condições dessa variável (Borges et al., 2010; Tsuzuki et al., 2007). Entretanto, alguns autores relataram um maior crescimento e melhor conversão alimentar

da espécie em água salobra (5-15) do que em salgada (Rocha et al., 2005; Tsuzuki et al., 2007). Esses resultados vão de encontro com os obtidos no presente estudo, onde a razão na excreção entre peixes alimentados e em jejum é maior em água salgada, indicando que o catabolismo dos aminoácidos ocorre dentro de uma faixa de salinidade ótima para o metabolismo da espécie. O aumento da salinidade deve tirar o peixe dessa zona metabólica favorável e ocasionar uma menor absorção da proteína consequentemente um aumento proporcional da excreção de amônia.

EXPERIMENTO II

O *C. parallelus* se mostrou ser um organismo tolerante aos níveis de amônia não-ionizada (NH_3) testados no presente trabalho, não apresentando mortalidade em nenhum dos tratamentos. Alguns estudos realizados mostram que os organismos expostos a concentrações de NH_3 iguais ou similares apresentaram mortalidade, como no trabalho de Okelsrud & Pearson (2007), utilizando *Lates calcarifer* nas concentrações de 0,5, 1, 1,5, 2, e 2,5 mg/L^{-1} de NH_3 , em que foi apresentado um aumento do nível de mortalidade em relação com o aumento da concentração de amônia não-ionizada. Guan et al. (2010) realizou um trabalho com *Cyprinus carpio* transgênicas e comuns e obtiveram o resultado de que a mortalidade de carpa transgênica foi significativamente mais elevada do que a carpa não-transgênica em todas as concentrações de amônia não ionizada ((0,91 \pm 0,12), (0,48 \pm 0,06) e (0,12 \pm 0,01) mg N / L^{-1}) durante os testes de toxicidade durante 21 dias.

A atividade de anidrase carbônica no presente estudo, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, porém houve um leve decaimento, não significativo, dos grupos expostos NH_3 quando comparados ao controle. Pode-se sugerir atividade da anidrase carbônica se manteve estável por não ter se ligado ao seu substrato inibido pelas concentrações de amônia. No trabalho de ArasHisar et al. (2004) apresentou diferença significativa na inibição da atividade enzimática logo nas primeiras horas de exposição do *Oncorhynchus mykiss* a amônia. Vários estudos recentes de organismos expostos outros contaminantes, mostraram que a atividade da

anidrase carbônica foi significativamente inibida (Mela et al., 2013; Zimmer et al., 2012).

O fígado é um dos órgãos mais afetados pelos contaminantes, visto que é o principal órgão desintoxicador. Segundo Atli & Canli (2010), o tecido hepático tem sido preferido para estudos de estresse oxidativo em relação aos outros tecidos, uma vez que ele apresenta elevadas taxas de atividade das enzimas antioxidantes. No presente estudo não foi observada nenhuma alteração nos valores da atividade da CAT nos exemplares de *C. parallelus* testados. Uma hipótese é de que a espécie do presente trabalho tenha usado outra via de desintoxicação, que não seja a CAT, para o contaminante do estudo. Hegazi et al. (2010) também observou que a atividade de GST no fígado teve um aumento significativo nos peixes expostos a 0,194 mg/L e 0,588 mg/L de amônia não-ionizada quando comparados com os controles. Segundo os autores, a exposição a este contaminante em organismos aquáticos pode aumentar a formação EROS no meio intracelular, que ativa capacidade da defesa antioxidante. Esta afirmação também é válida para o presente estudo uma vez que ambos os trabalhos utilizaram o mesmo contaminante.

As brânquias são órgãos multifuncionais que atuam como uma interface entre o animal e o ambiente, são conhecidas como órgão-alvo em peixes, sendo o primeiro a reagir em condições ambientais desfavoráveis. Como desempenham papel fundamental para as trocas gasosas e para a regulação osmóticas, alterações histológicas branquiais podem afetar diretamente os mecanismos de respiração e osmorregulação (Martinez et al., 2006). No experimento realizado, as alterações mais predominantes foram hiperplasia e hipertrofia em todos os tratamentos. Quando exposto a salinidade 40 à 0,5 mg/L e 1mg/L de amônia não ionizada foi observado uma fusão da lamela. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Romano & Zeng (2007), onde *Portunus pelagicus* exposto a 5 mg/L de amônia não-ionizada expostos por 96 horas na salinidade 30 sofreram alterações epiteliais. Danos semelhantes foram observados também no trabalho de Chezhian et al (2012), que expos *Cyprinus carpio* à 27 ppm de amônia não-ionizada em pH 5 no tempo de 96 horas. Diante dos resultados apresentados, sugere-se que a amônia não ionizada causa maiores danos hitopatológicos no epitélio branquial nas salinidades acima de 20 provavelmente por um aumento de troca iônica

aumentando assim o contado do órgão com o contaminante. Os índices de alterações histopatológicas foram menores do que dez o que indica que apesar alterações observadas, as brânquias apresentavam função normal. Os níveis de alterações branquiais variam de acordo com o tóxico utilizado e o tempo de exposição (Delunardo et al., 2013).

6. CONCLUSÕES

A excreção de amônia para o *C. parallelus* em jejum e alimentado diminui exponencialmente com o aumento da salinidade.

A exposição aguda (96h) a até 1mg/L de amônia não ionizada se mostrou pouca toxica para o *C. parallelus*, do ponto de vista do metabolismo oxidativo e de danos histológicos nas brânquias.

O *C. parallelus* é um peixe moderadamente tolerante aos efeitos tóxicos da amônia testados neste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.

Altinok, I.; Grizzle, J.M. 2004. Excretion of ammonia and urea by phylogenetically diverse fish species in low salinities. ***Aquaculture***, 238: 499–507.

Álvarez, R.M.M.; Sanza, A.; Gallego, M.G.; Domezainb, A.; Domezainb, J.; Carmonac, R.; Garridoc, M.V.O.; Moralesa, A.E. 2005. Adaptive branchial mechanisms in the sturgeon *Acipenser naccarii* during acclimation to saltwater. ***Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology***, 141 (2): 183-190.

APHA (1998). **Standard Methods for examination of water and the wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20^oed. Washington.

Arana, L. V. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1997. 166 p.

ArasHisar, S.; Hisar, O.; Yanik, T.; Aras, S.M. 2004. Inhibitory effects of ammonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). ***Environmental Toxicology and Pharmacology***. 17: 125-128.

Barbieri, E.; Doi, S.A. 2012. Acute toxicity of ammonia on juvenile cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. ***Aquaculture International***. 20: 373-382.

Benli, A.Ç.K.; Köksal, G.; Özkul, A. 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. ***Chemosphere***, 72: 1355–1358.

Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010, disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>

Borges, J.C.S.; Pressinotti, L.N.; Gomes, V.; Silva, J.R.M.C. 2010. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (*Centropomus parallelus*, POEY 1860). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 386: 39-44.

Cavalli, R.O.; Domingues, E.C.; Hamilton, S. 2011. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 40: 155- 164

Cavalli, R.O.; Berghe, E.V.; Lavens, P.; Thuy, N.T.T.; Wille, M.; Sorgeloos, P. 2000. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 125: 333–343.

Cavero, B.A.S.; Pereira-Filho, M.; Bordinhon, A.M.; Fonseca, F.A.L.; Ituassú, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A. 2004. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39(5): 513-516.

Chezhian, A.; Senthamilselva, D.; Kabilan, N. 2012. Histological changes induced by ammonia and pH on the gills of fresh water fish *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linnaeus). **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**. 1-9.

Chinga, B.; Chewb, S.F.; Wonga, W.P.; Ip, Y.K. 2009. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). **Aquatic Toxicology**. 95: 203–212.

Delunardo, F.A.C., Silva, B.F.D., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., Chippari-Gomes, A.R. 2013. Genotoxic and morphological damage in *Hippocampus reidi* exposed to crude oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 87 : 1-9.

Eddy, F.B. 2005. Ammonia in estuaries and effects on fish. **Journal of Fish Biology**, 67: 1495–1513.

El-Shafai, S.A.; El-Gohary, F.A.; Nasr, F.A.; Steen, N.P.; Gijzen, H.J. 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, 232: 117–127.

Ezemonye, L., Tongo, I., 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). **Chemosphere**. 81, 214-217.

Fundo da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO. **El Estado Mundial de la pesca y la Acuicultura**. Rome, FAO, 2000.

Frick, N.T.; Wrigth, P.A. 2002. Nitrogen metabolism and excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus* I. The influence of environmental salinity and external ammonia. **The Journal of Experimental Biology**. 205, 79-89.

Foss, A.; Siikavuopio, S.I.; Sæther, B.S.; Evensen, T.H. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod. **Aquaculture**, 237: 179–189.

Gadagbui, B.K.M.; James, M.O. 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. **Aquatic Toxicology**. 49, 27-37.

Gonçalves-Soares, D., Zanette, J., Yunes, J.S., Yepiz-Plascencia, G.M., 2012. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. **Marine Environmental Research**. 75, 54-61.

Guan, B.; Hu, W.; Zhang, T.; Duan, M.; Li, D.; Wang, Y.; Zhu, Z. 2010. Acute and chronic un-ionized ammonia toxicity to “all-fish” growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). **Chinese Science Bulletin**. 55(35): 4032-4036.

Habig, W.H., Pabst, W.B., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**. 249, 7130-7139.

Habig, W.H., Jakoby W.B., 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. **Methods Enzymol**. 77, 398-405.

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

Harris, R.R.; Coley, S.; Collins, S.; McCabe, R. 2001. Ammonia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). **Journal of Comparative Physiology B**, 171: 681–693.

Hegazi, M.M.; Attia, Z.I.; Ashour, O.A. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. **Aquatic Toxicology**. 99: 118-125.

Ichise, N., Hirota, K., Ichihashi, D., Nodasaka, Y., Morita, N., Okuyama, H., Yumoto, I., 2008. H₂O₂ Tolerance of *Vibrio rumoiensis* S-1^T is Attributable to the Cellular Catalase Activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 106, 39-45.

Kim, J., Kim, S., An, K.W., Choi, C.Y., Lee, S., Choi, K., 2010. Molecular cloning of *Daphnia magnacatalase* and its biomarker potential against oxidative stresses. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 152, 263-269.

Le François, N.R.; Savoie, A.; Siikavuopio, S.I. 2008. Gill metabolic and osmoregulatory responses of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) to chronic ammonia exposure. **Journal of Applied Ichthyology**, 24: 112–115.

Levi, G.; Morisi, G.; Coletti, A.; Catanzaro, R.1974. Free Amino Acids in Fish Brain: Normal Levels And Changes Upon Exposure To High Ammonia Concentrations *In Vivo*, And Upon Incubation of Brain Slices. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 49 A: 623-636.

Li, X., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, X., Starkey, S.R., Yan, K., 2009. Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 39, 745-754.

Liang, X.; Nie, X.; Ying, G.; An, T.; Li, K. 2013. Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. **Chemosphere**. 90(3): 1281-1288.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological of chemical**. 193, 265-275.

Lupi, C.; Nhacarini, N.I.; Mazon, A.F; Sá, O.R. 2007. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe On Line**, 3: 1-16.

Martinez, C.B.R.; Azevedo, F.; Winkaler, E.U. 2006.**Toxicidade e Efeitos da Amônia em Peixes Neotropicais**. p 1-15.

McCormick, S.D. 2001. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish 1. **American Zoologist**, 41: 781–794.

Nickum, J.G., Bart, H.L., Bowser, P.R., Greer, I.E., Hubbs, C., Jenkins, J.A., Macmillan, J.R., Rachlin, J.W., Rose, J.D., Soresen, P.W., Tomasso, J.R. 2004. **Guidelines for the use of fishes in research**. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

Okelsrud, A.; Pearson, R.G. 2007. Acute and postexposure effects of ammonia toxicity on juvenile barramudi (*Lates calcarifer* [Bloch]). **Arch Environmental Contaminant Toxicology**. 53: 624-631.

Ostrensky, A.; Wasielesky Jr., W. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. **Aquaculture**. 132: 339-347

Pereira, L.P.F.; Mercante, C.T.J. 2005. A Amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma Revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, 31(1): 81–88.

Randall, D.J.; Tsui, T.K.N. 2002. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, 45: 17–23.

Ren, Q., Sun R.R., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2009. A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S- transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 149, 613-623.

Richly, J.; Marina, B.A. 1977. The ammonia excretion of trout during a 24-hour period. **Aquaculture**. 11:173-178.

Rocha, A.J.S.; Gomes, V.; Ngan, P.V.; Passos, M.J.A.C.R.; Furia, R.R. 2005. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 316: 157-165.

Romano, N.; Zeng, C. 2007. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. **Aquaculture**. 266: 246-254.

Sampaio, L.A.N. 2000. Peixe-rei marinho: Reprodução e larvicultura. **Revista Panorama da Aquicultura**. 10 (59): 15 – 18.

Sinha, A.K.; Giblen, T.; AbdElgawad, H.; De Rop, M.; Asard, H.; Blust, R.; De Boeck, G. 2013. Regulation of amino acid metabolism as a defensive strategy in the brain of three freshwater teleosts in response to high environmental ammonia exposure. **Aquatic Toxicology**. 130-131: 86-96.

Soublé, J.F.; Shurben, D.G. 1989. Toxicity of ammonia to early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Water Research**. 23(1): 127-129

Tsuzuki, M.Y.; Cerqueira, V.R.; Teles, A.; Doneda, S. 2007. Salinity Tolerance of Laboratory Reared Juveniles of the Fat Snook *Centropomus parallelus*. **Brazilian Journal of Oceanography**, 55(1): 1-5.

Tsuzuki, M.Y.; Sugai, J.K.; Maciel, J.C.; Francisco, C.J.; Cerqueira, V.R. 2007. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. **Aquaculture**. 271: 319-325.

Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez, E.M.; 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 122 C: 121–129.

Wang, A.L.; Wang, W.N.; Wang, Y.; Li-Xin Shang, L.X.; Liu, Y.; Sun, R.Y. 2003. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption, ammonia-N excretion and Na⁺/K⁺ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. **Aquaculture**, 220: 833–841.

Weihrauch, D.; Wilkie, M.P.; Walsh, P.J. 2009. Ammonia and urea transporters in gill of fish and aquatic crustaceans. **The Journal of Experimental Biology**. 212: 1716-1730.

Wilkie, M.P. 1997. Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 118A(1): 39–50.

Wright, P.A.; Wood, C.M. 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. **The Journal of Experimental Biology**. 212: 2303-2312.

Wu, B.; Sun, S. 2006. Ammonia and urea excretion of the nemertean *Procephalothrix simulus* Iwata: effects of salinity, temperature, body weight and amputation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 337: 13–18.

Yu, C.Z., Snodgrass, G.L., Chen, M.S., 2007. Comparative study on glutathione S-transferase activity, cDNA, and gene expression between malathion susceptible and resistant strains of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 87, 62-7