

Determinação da toxicidade aguda de cloreto de amônia para uma espécie de peixe (*Hyphessobrycon callistus*) indicadora regional

Determination of ammonia chloride acute toxicity for a region specific fish species (*Hyphessobrycon callistus*)

Determinación de la toxicidad aguda del cloruro de amoníaco para una especie específica de pescados regionales (*Hyphessobrycon callistus*)

Murilo Damato*
Edison Barbieri**

RESUMO: Ensaios ecotoxicológicos têm sido utilizados como uma importante ferramenta na avaliação da qualidade ambiental. Com o objetivo de destacar o uso de organismos nativos em ensaios crônicos de curta duração, este estudo avaliou o potencial do peixe *Hyphessobrycon callistus*. Ensaios semiestáticos foram realizados expondo organismos adultos às concentrações de 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; e 2,5 mg.L⁻¹ ao Cloreto de amônia (NH₄Cl). A resposta de sensibilidade foi cerca de 3 a 4 vezes menor que os demais ensaios reportados na literatura. Dessa forma, estudos complementares são necessários para estabelecer as condições ótimas de exposição e verificar a possibilidade de efeitos subletais mais sensíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicidade. Amônia. Meio Ambiente.

ABSTRACT: Ecotoxicological assays have been used as an important tool in the evaluation of environmental quality. With the objective to emphasize the relevance of the use of native organisms in short-duration chronic assays, this study evaluated the potential of *Hyphessobrycon callistus*. Static tests were carried through exposing adult organisms to the following concentrations of Ammonia Chloride (NH₄Cl): 0.5; 0.75; 1.0; 1.5; 2.0; e 2.5 mg.L⁻¹. The sensitivity response was about 3 to 4 times lesser than that of assays reported in the literature. This way, complementary studies are necessary to establish the optimal conditions of exposition and to verify the possibility of a more sensible sublethal effect.

KEYWORDS: Toxicity. Ammonia. Environment.

RESUMEN: Los análisis ecotoxicológicos se han utilizado como herramienta importante en la evaluación de la calidad ambiental. Con el objetivo de acentuar la importancia del uso de organismos nativos en análisis crónicos de corta duración, este estudio evaluó el potencial del *Hyphessobrycon callistus*. Pruebas estáticas fueron realizadas exponiendo organismos adultos a las siguientes concentraciones del cloruro de amoníaco (NH₄Cl): 0.5; 0.75; 1.0; 1.5; 2.0; e 2.5 mg.L⁻¹. La respuesta de la sensibilidad fue cerca de 3 a 4 veces menos que el de los análisis divulgados en la literatura. Así, se necesitan estudios complementarios como para establecer las condiciones óptimas de exposición y verificar la posibilidad de un efecto sublethal más sensible.

PALABRAS-LLAVE: Toxicidad. Amoníaco. Ambiente.

* Doutor pelo Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Professor do curso de Gestão Ambiental da PUC-SP.

** Doutor em Oceanografia pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Pesquisador e Professor do Instituto de Pesca – APTA-SAASP. Cananea-SP, Brasil. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

Introdução

Toxicidade é a característica de uma substância de 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 compensação¹. Essas respostas podem ser avaliadas por meio de experimentos de laboratório genericamente denominados “testes de toxicidade”. Os testes de toxicidade são a ferramenta mais adequada para se avaliar a toxicidade de uma substância química ou de um efluente². Podem ser definidos como estimativas da concentração de substâncias biologicamente ativas, consideradas a partir dos efeitos observados em organismos utilizados para teste^{3,4}, ou, ainda, como procedimentos nos quais respostas de organismos são utilizadas para detectar ou medir a presença ou efeito de uma ou mais substâncias, isoladas ou combinadas aos fatores ambientais^{2,4,5}. Consistem, basicamente, na exposição de organismos a diferentes condições-teste, visando, desse modo, mensurar os efeitos letais e/ou subletais dessas condições.

De maneira geral, os testes de toxicidade demonstram o efeito deletério de uma ou mais substâncias químicas a um ou mais grupos de organismos, identificando as concentrações que causam efeitos deletérios à biota. Os resultados são comumente utilizados para estimar concentrações “seguras” de substâncias químicas no ambiente aquático.

Testes de toxicidade são necessários para avaliar a poluição aquática, uma vez que os testes físico-químicos não são capazes de revelar os efeitos deletérios causados à biota e nem são capazes de medir todos os compostos químicos^{6,7,8,9,10}.

Esses testes podem, ainda, variar de acordo com a duração, com o efeito observado, com a forma de exposição às soluções usadas e tipo de respostas.

No que diz respeito ao tempo de exposição, os testes podem ser de curta ou longa duração, ou seja, podem ser agudos ou crônicos. Testes agudos são aqueles que a resposta está restrita a um estágio definido do ciclo de vida^{10,11}. Os testes agudos, geralmente, usam como medida a mortalidade ou imobilidade do organismo no experimento, enquanto os testes crônicos visam medir efeitos deletérios que possam abranger a totalidade do ciclo de vida ou parte dele¹².

Também a forma de exposição do organismo testado ao poluente é um fator importante que deve ser levado em consideração. A forma de exposição ao poluente pode ser estática, quando não há reposição do poluente; semiestática, quando há reposição periódica da solução-teste; e de fluxo contínuo, quando há reposição contínua da solução teste.

Para poder estimar os efeitos deletérios de materiais tóxicos sobre o meio ambiente, é necessário, frequentemente, obter respostas rápidas^{13,14,15}. Nesse sentido, os testes de toxicidade aguda são ferramentas importantes e confiáveis para estimar as concentrações de um determinado produto tóxico que provocam efeitos deletérios em uma dada população de organismos^{16,17}.

Com relação à resposta aos testes de toxicidade, podem ser identificados dois tipos: letais e subletais. Nos testes de respostas letais, utiliza-se, como padrão, a LC50 (*Letal Concentration 50%*), isto é, a concentração que causa a morte de 50% dos organismos-teste durante certo tempo de exposição. As respostas subletais são avaliadas com base no EC50 (*Effective Concentra-*

tion 50%), que se trata da concentração capaz de causar algum efeito deletério em 50% dos organismos-teste. O EC50 avalia alterações específicas de comportamento ou efeitos subletais (perda de equilíbrio, paralisia, deformidades, etc.). Outro parâmetro comumente encontrado na literatura é a NOEC (*Non Observed Effect Concentration*) ou Concentração de Efeitos Não Observáveis. Além desses testes, podemos, ainda, avaliar condições fisiológicas ou comportamentais dos organismos experimentais, como, por exemplo, metabolismo, consumo de oxigênio, capacidade de natação, capacidade de fuga, poder de adesão, produção de substâncias indicadoras de estresse, etc.^{18,19}.

Os critérios de seleção de organismos para testes de toxicidade, segundo Pereira, et al²⁰ são: disponibilidade, sensibilidade ao agente químico, tolerância ao manuseio, tolerância a fatores bióticos, ciclo de vida, relevância ecológica e/ou econômica, distribuição geográfica, existência de metodologia padronizada, requisitos legais, validação em campo.

Os organismos aquáticos são indicadores sensíveis da qualidade da água. Assim, são muito apropriados para serem utilizados como “instrumento” no controle da poluição das águas, que tem por finalidade principal a manutenção da vida em todas as suas formas e manifestações.

Há muito que os testes de toxicidade vêm sendo utilizados nesse campo^{21,22,23}, e sua importância cresce à medida que se reconhece seu valor e a possibilidade de sua utilização em diversos tipos de estudos. Segundo Pereira, et al²⁰, utilizando-se essa técnica de trabalho, é possível avaliar: a toxicidade relativa de diferentes efluentes ou substâncias sobre uma determinada espécie ou um número de espécie; a sensibilidade ou re-

siliência relativa de organismos aquáticos frente a um efluente ou substância tóxica; a concentração limite de uma substância na água necessária à vida aquática; o grau de tratamento necessário a um efluente para que preencha os requisitos determinados por órgãos de controle de poluição das águas; a eficiência de diferentes métodos de tratamento de efluentes; a concentração máxima permissível de agentes químicos e efluentes líquidos industriais, tratados ou não, em um corpo receptor; concentrações e níveis favoráveis e desfavoráveis de fatores ambientais – tais como pH, temperatura, salinidade, turbidez, teor de oxigênio dissolvido, luminosidade – adequados à vida aquática.

Os procedimentos toxicológicos mais urgentes, no momento, exigem a inclusão do estabelecimento de critérios e a padronização de métodos de controle da poluição, visando, principalmente, estabelecer os limites máximos aceitáveis de poluentes na água do mar e prevenir e avaliar as possíveis consequências biológicas desses poluentes nos ecossistemas¹³.

O procedimento mais adequado para se avaliar a toxicidade de um poluente é estudar seus efeitos sobre vários organismos representantes dos diferentes níveis tróficos. Na impossibilidade de se trabalhar com vários organismos, deve-se escolher, cuidadosamente, um bom organismo-teste. As características relevantes nessa escolha são: importância ecológica, disponibilidade ao longo do ano, facilidade de obtenção e manutenção em laboratório e, principalmente, notada sensibilidade à substância-teste.

Para este trabalho, foram escolhidos o peixe *Hyphessobrycon callistus*, por possuir as características acima citadas, e a amônia como substância tóxica, por ser esta o principal produto de excreção dos organismos aquáticos. A amônia é

um composto resultante do catabolismo das proteínas²⁴, sendo encontrada no ambiente na forma de amônia não ionizada (NH_3), que é de natureza lipofílica, possuindo, assim, afinidade pelas gorduras, e, por isso, difunde-se facilmente pelas membranas respiratórias. Encontra-se, também, no meio aquático, a amônia ionizada (NH_4^+), que tem características lipofóbicas, penetrando menos rapidamente nas membranas, que são de características lipoproteicas²⁵. Convencionou-se chamar a soma de NH_3 + NH_4^+ de amônia ou amônia total.

A amônia pode atingir níveis letais ou subletais em sistemas de cultivos estáticos ou de circulação. Esse fato faz com que seja muito importante a determinação dos limites de tolerância dos organismos aquáticos em relação a ela para o seu cultivo²⁶. Altas concentrações de amônia podem estar presentes em águas de ambientes naturais que recebem efluentes domésticos, industriais e agrotóxicos²⁷. O objetivo do presente trabalho foi determinar a toxicidade aguda do cloreto de amônia para uma espécie indicadora regional, *Hyphessobrycon callistus*.

Material e Métodos

O método para o desenvolvimento desses testes está baseado nas 17ª e 18ª ed. do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*^{28,29}:

a) os testes foram realizados em sistema semiestático, com renovação da solução-teste a cada 24 horas;

b) a água de diluição utilizada foi a desionizada, com dureza e alcalinidade ajustadas entre 40 e 48 mg/L de CaCO_3 . O sal utilizado para os experimentos foi o cloreto de amônia (NH_4Cl) da Merck.

c) utilizou-se 10 peixes por concentração, com três réplicas cada.

- Os pesos dos peixes utilizados na réplica I foram: 0,2594 a 0,5202 g; na réplica II: 0,3591 a 0,5499 g; e na réplica III: 0,2513 a 0,5787 g.

- Os comprimentos foram: 23,07 a 29,79 mm para a réplica I; 25,37 a 29,24 mm para a réplica II; e 23,88 a 29,04 mm para a réplica III.

Todos os aquários foram monitorados nos instantes de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, considerando os parâmetros físicos, químicos e biológicos: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e mortalidade dos animais expostos.

Os *pHs* foram: réplica I: 6,79 a 7,68; réplica II: 6,72 a 7,74; e réplica III: 6,50 a 7,58.

Oxigênio dissolvido: réplica I: 6,1 a 7,6 mg/L; réplica II: 5,4 a 7,8 mg/L; e réplica III: 6,3 a 8,1 mg/L.

A temperatura ficou entre 21,5 e 22,5°C para as três réplicas

A dureza ficou entre: réplica I: 44 e 48 mg de CaCO_3 /L; réplica II: 40 e 48 mg de CaCO_3 /L; e réplica III: 42 e 48 mg de CaCO_3 /L.

A alcalinidade ficou entre: réplica I: 30 e 34; réplica II: 28 e 36; e réplica III: 30 e 34.

Para a avaliação do parâmetro mortalidade dos organismos, foram determinados a CL(I)50,24h, CL50(I),48h, CL50(I),72h, CL50(I)50,96h, isto é, à concentração nominal do agente tóxico que causa mortalidade a 50% dos organismos em 24, 48, 72, e 96 horas de exposição nas condições de teste. A expressão dos valores nominais com a notação (I) segue a proposta de Lloyd, Tobby³⁰. Empregou-se o método de Sperman-Karber para a avaliação da toxicidade aguda, CL(I)50, conforme consta em Hamilton³¹.

Utilizou-se a equação de Emerson³², em que a fração de amônia livre pode ser dada pela fórmula: $f = 1 / (10^{(pK_a - pH)} + 1)$. Considerando-se Pk_a igual a 9,36 (23°C) e

as variações de pH situando-se entre 6,89 e 7,60, o valor de *f* variou entre 0,0034 e 0,0171.

A espécie *Hyphessobrycon callistus* foi escolhida por ser nativa e de ampla distribuição no Estado de São Paulo. Essa foi a espécie utilizada por ser de fácil aquisição, disponível durante quase todo o ano, e de excelente adaptação ao laboratório. Os organismos foram adquiridos de criadores, na região de Mogi das Cruzes, e posteriormente aclimatados no laboratório.

Resultados

Constatou-se que as CL(I)50, nos diversos períodos, apresentaram diferenças entre os intervalos de confiança, sendo que os resultados das três réplicas não apresentaram variações significativas.

As CL(I)50,96h, para as três amostras, foram, respectivamente, de 715,84; 706,77; e 540,65 mg de NH₄Cl/L (equivalente a 187,16; 184,96; e 141,49 mg de NH₃/NH₄⁺/L). Considerando a equação de Emerson³², em que a fração de amônia livre pode ser dada pela equação $f = 1 / (10^{(pKa - pH)} + 1)$, e considerando-se Pka igual a 9,36 (23°C) e as variações de pH situando-se entre 6,89 e 7,60, o valor de *f* variou entre 0,0034 e 0,0171. Multiplicando esses valores pela CL(I)50,96h, tem-se que a concentração aproximada para causar letalidade aguda da amônia não ionizada situa-se entre 0,068 e 0,09 mg/L.

Discussão

OVárias espécies de peixes vêm sendo utilizadas com bastante sucesso para estudar a toxicidade da amônia^{26,33,34,35}. Os resultados do presente trabalho demonstram ser o *Hyphessobrycon callistus* bastante apropriado para a realização de

bioensaios com o objetivo de se avaliar os efeitos de contaminantes em efluentes. As altas taxas de sobrevivência nas réplicas do controle confirmam esse fato. Além

da facilidade de coleta, estocagem e manuseio, os juvenis podem ser também criados em cativeiro, permitindo que fatores considerados importantes na escolha de animais

Tabela 1. Variação da toxicidade aguda de cloreto de amônia para *H. callistus* em diferentes períodos de exposição

	CL(I)50	Intervalo deConfiança	
	mg de NH ₄ Cl/L	Limite Inferior	Limite Superior
Réplica 1			
24h	846,93	793,62	903,82
48h	821,53	790,84	853,52
72h	782,44	764,40	832,22
96h	715,84	664,83	770,77
Réplica 2			
24h	852,87	794,64	904,87
48h	845,92	794,70	901,92
72h	808,32	783,75	833,67
96h	706,77	661,56	755,08
Réplica 3			
24h	821,56	626,91	1076,70
48h	687,81	605,79	780,94
72h	568,90	516,65	626,46
96h	540,65	492,23	593,83

Tabela 2. Variação da toxicidade aguda da amônia total (NH₃ + NH₄⁺) para *H. callistus* em diferentes períodos de exposição

	CL(I)50	Intervalo deConfiança	
	mg de NH ₃ + NH ₄ ⁺ /L	Limite Inferior	Limite Superior
Réplica 1			
24h	221,64	207,69	236,52
48h	214,99	206,96	223,37
72h	204,77	195,33	214,65
96h	187,34	173,99	201,71
Réplica 2			
24h	-	-	-
48h	221,64	207,69	236,53
72h	211,54	205,11	218,17
96h	184,96	173,13	197,60
Réplica 3			
24h	215,00	164,06	281,77
48h	180,00	158,53	204,37
72h	148,88	135,21	163,95
96h	141,49	128,84	155,41

Tabela 3. Variação da toxicidade aguda da amônia não ionizada (NH₃) para *H. callistus* em diferentes períodos de exposição

	CL(I)50	Intervalo de Confiança	
	mg de NH ₃	Limite Inferior	Limite Superior
Réplica 1			
24h	0,653	0,611	0,696
48h	0,539	0,519	0,560
72h	0,098	0,093	0,103
96h	0,090	0,083	0,097
Réplica 2			
24h			
48h	0,653	0,611	0,696
72h	0,530	0,514	0,547
96h	0,089	0,083	0,095
Réplica 3			
24h	0,633	0,483	0,830
48h	0,451	0,397	0,512
72h	0,071	0,065	0,078
96h	0,068	0,062	0,074

experimentais para bioensaios, tais como homogeneidade de tamanho, estágio de desenvolvimento, idade e qualidade dos mesmos, possam ser facilmente controlados.

Concentrações letais e subletais de amônia podem causar modificações histológicas nos rins, fígado, baço e sangue de muitas espécies de peixes³³. Segundo Thurston, et al³⁶, concentrações subletais de amônia não ionizada (0,04 mg/L) em trutas arco-íris, ao longo do seu ciclo de vida, provocam danos histopatológicos como: hipertrofia com necrose das lâminas branquiais e degeneração dos tubos renais, devido à necrose generalizada.

A amônia pode, também, afetar o transporte de oxigênio nos tecidos. Esses efeitos incluem lesões nas brânquias, diminuição da capacidade de transporte de oxigênio – devido ao baixo pH do sangue –, incremento do ritmo respiratório e dano histológico nas células do sangue e nos tecidos que

as produzem³⁴. Segundo Burrows³⁷ a amônia não ionizada provocou o aparecimento de hiperplasia do epitélio branquial em trutas expostas por 42 dias, a menos de 0,003 mg/L.

Ball³⁸ determinou a LC50,48h da amônia não ionizada para os peixes: *Perca Fluviatilis* (0,29 mg/L), *Rutilus rutilus* (0,35 mg/L), *Scardinius erythrophthalmus* (0,36 mg/L), *Abramis brama* (0,41 mg/L) e *Salmo gairdnei* (0,41 mg/L). Segundo Arana²⁶, o LC50,96h da amônia não ionizada para *Sciaenops ocellatus* foi 0,39 mg/L. Já Colt, Tchobanoglous³⁴ determinaram a LC50,96h para o bagre *Ictalurus punctatus*, obtendo-se 3,8 mg/L de NH₃. Neste trabalho, a concentração aproximada para causar letalidade aguda em *Hyphessobrycon callistus* situou-se entre 0,6 e 3,2 mg/L. Para a espécie *Odontotesthes argentinensis* os valores de LC50 para juvenis de 0,14g foram de 1,48; 1,30; 0,80 mg/L de NH₃ em 24, 48, 72 e 96 horas³⁵.

O aumento da amônia no meio externo pode reduzir sua excreção, conforme indicam estudos realizados em trutas (*Salmo gairdneri*), goldfish (*Carassius auratus*), caranguejos (*Callinectes sapidus*) e o camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). Devido à crescente dificuldade para excretar amônia, a primeira reação dos animais aquáticos pode ser a diminuição ou a paralisação da atividade alimentar para minimizar a produção de amônia metabólica. Por isso, um dos elementos subletais mais significativos desse composto de excreção será a diminuição da taxa de crescimento corpóreo²⁶.

Em nível celular, a amônia pode bloquear o processo de fosforilação oxidativa e, consequentemente, diminuir o crescimento dos animais, tendo em vista a incapacidade desses em converter a energia alimentar em ATP³⁹. Os Hormônios corticosteroides podem ser liberados frente a uma exposição subletal de amônia²⁶. Esses hormônios provocam um balanço negativo do nitrogênio, devido à desaminação dos aminoácidos, impossibilitando esse processo essencial para o crescimento⁴⁰. Um nível de 50 a 200 ug/L de NH₃ provoca uma redução significativa do crescimento na maioria dos animais aquáticos²⁶.

Verificou-se, assim, que a toxicidade aguda da amônia para *H. callistus* é inferior a 4,0 mg de NH₃/L. Como essa forma é muito mais tóxica que a ionizável, é necessário que as análises da toxicidade do nitrogênio amoniacal sejam feitas com cautela, levando em conta o pH e a temperatura da amostra do efluente, a fim de se avaliar a quantidade disponível de amônia no corpo receptor.

REFERÊNCIAS

1. Carr RS, Carran MD. Evaluation of the archiannelid *Dinophilus gyrociliatus* for use in short-term life-cycle toxicity tests. *Environ Toxicol Chem.* 1986;5:703-12.
2. Long ER. An assessment of marine pollution in Puget Sound. *Mar Pollut Bull.* 1982;13:380-3.
3. Chapman PM, Long ER. The use of bioassay as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar Poll Bull.* 1983;14(3):81-4.
4. Barbieri E, Serralheiro PC, Rocha IO. The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate (LAS-C12) on the Mugil platanus (mullet) according to the temperature and salinity. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2002;277:109-27.
5. Barbieri E. Use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the sublethal toxicity of cadmium and zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). *W Environ Res.* 2007;79(6):641-6.
6. Tarzwell CM. Bioassays to determine allowable waste concentrations in the aquatic environment. I-Measurement of pollution effects on living organisms. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1971;177:279-98.
7. Pantini C, Spret N, Maggitti MC, Germani, R. Acute toxicity of some synthetic cationic and zwitterionic surfactants to freshwater amphipod *Echinogammarus tibaldii*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1995;55(2):179-86.
8. Barbieri E. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture.* 2010;306:329-33.
9. Barbieri E, Paes ET. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere.* 2011;84(1):9-16.
10. Barbieri E. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicology.* 2009;18(2):312-8.
11. Welch EB. *Ecological Effects of Wastewaters.* Cambridge: Cambridge University Press; 1980. 343 p.
12. CETESB. Água do mar-teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816. CETESB, São Paulo. Norma Técnica L5, 1992;250:20p.
13. Phan VN, Gomes V. Avaliação prévia da toxicidade de um efluente simulado derivado de petróleo sobre *Promysis atlantica* (Crustacea, Mysidacea). *Bolm Inst Oceanogra S Paulo.* 1994;42(1/2):129-41.
14. Barbieri E, Phan VN, Gomes V. Efeito do DSS, dodecil sulfato de sódio, no metabolismo e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. *Rev Bras Biol.* 1998;58(2):263-71.
15. Barbieri E. Use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the sublethal toxicity of cadmium and zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). *W Environ Res.* 2007;79(6):641-6.
16. Ward GS, Parrish PR. *Manual of methods in Aquatic Environment Research.* Part. 6. Toxicity tests. FAO Fish Tesch Pap N. 185. 1982. 23p.
17. Capuzzo JM, Morroe MN, Widdows J. Effects of toxic chemicals in the marine environment: predications of impacts from laboratory studies. *Aquat Toxicol.* 1988;11:303-11.
18. Paasivirta J. *Chemical ecotoxicology.* Edit. Lewis Publishers, USA; 1991. 209 p.
19. Barbieri E, Doi SA. Acute toxicity of ammonia on juvenile cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. *Aquaculture International.* 2012. DOI 10.1007/s10499-011-9467-3 (In press).
20. Pereira DN, Goldstein EG, Zagatto PA, Sassi R. Bioensaios: um programa a serviço do controle da poluição resultados iniciais. *Rev Ambiente.* 1987;1(1):32-6.
21. EPA. Environmental Protection Agency. Methods for acute toxicity testes with fish, macroinvertebrates, and amphibians. *Ecol Res Service.* 1975. Epa-660/3-75-009, 62p.
22. ISO. International Organization for Standardization. Document isoltc 147/SC 5/Wg 3 Secretariat 6, 10 e 11. Round Robin test programme. 1975.
23. APHA. American Public Health Association. *Standard methods of the examination of water and waster.* 16th ed. New York: American Public Health Association; 1985.
24. Campbell J. Nitrogen excretion. In: Prosser CL, editor. *Comparative animal physiology.* Philadelphia: W. B. Saunders; 1973. p. 279-316.
25. Kormanik GE, Cameron J. Ammonia excretion in animals that breathe water, a review. *Mar Biol Lett.* 1981;(2):11-2.
26. Arana LV. *Princípios químicos da qualidade da água em aqüicultura.* Editora da UFSC. Florianópolis; 1997. p. 166.

27. Chen JE, Kou Y. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Oreochromis monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*. 1993;(109):177-85.
 28. APHA. American Public Health Association. Standard methods for examination of water and wastewater. 17th ed. Washington D.C.; 1989. 1140 p.
 29. APHA. American Public Health Association. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed. Washington D.C.; 1992. 1316 p.
 30. Lloyd R, Tooby TE. New terminology required for short-term static fish bioassay LC(I)50. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1979;22(1):1-3.
 31. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol*. 1977;11(7):714-9.
 32. USEPA. United States Environmental Protection Agency. Water quality criteria for ammonia. Washington D.C.; 1984. 217 p.
 33. Smith G, Piper R. Lesions associated with chronic exposure to ammonia. In: Ribelin WE, Migaki G, editors. *The pathology of Fishes*. Madison: University of Wisconsin Press; 1975. p. 497-514.
 34. Colt J, Armstrong D. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. In: Allen L, Kinney E, editors. *Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture*. Fish Culture Section of the American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA; 1981. p. 34-47.
 35. Ostrensky A, Brugger A. Studies on the viability of silverside *Odontesthes argentinensis* cultivations: acute toxicity of ammonia. *Ciênc Cult*. 1992;44(2/3):413-4.
 36. Thurston R, Russo R, Lueotke R. Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. *Trans Am Fish Soc*. 1984;(113):56-73.
 37. Burrows R. Effects of accumulated excretory products on hatchery reared salmonids. U. S. Fish and Wildlife Service Res. 1964. Rept. 66.
 38. Ball I. The relative of some species of fresh-water fish to poisons I. Ammonia. *Water Res*. 1987;1:767-75.
 39. Russo R, Thurston R. The acute toxicity of nitrite to fishes. In: R. Tubb, editor. *Recent Advances in Fish Toxicology*. U. S. Environmental Protection Agency, EPA-600/3-77-085. U. S. Government Printing Office, Washington, D. C. 1977; p. 118-31.
 40. Parker N, Davis K. Requirements of warmwater fish. In: Allen L, Kinney E, editors. *Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture*. Fish Culture Section of the American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. 1981; p. 21-8.
-

Recebido em 14 de abril de 2011
Versão atualizada em 30 de maio de 2011
Aprovado em 28 de junho 2011