

FABIANA PENALVA DE MELO

**EFEITO DA TOXICIDADE DO NITRITO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA,
CONSUMO ALIMENTAR E RESPOSTA IMUNE DO CAMARÃO
Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931)**

RECIFE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**EFEITO DA TOXICIDADE DO NITRITO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA,
CONSUMO ALIMENTAR E RESPOSTA IMUNE DO CAMARÃO**
Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931)

Fabiana Penalva de Melo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia
Orientador

Recife
Fevereiro/2016

Ficha catalográfica

C837a Melo, Fabiana Penalva de
Efeito da toxicidade do nitrito sobre a sobrevivência, consumo alimentar e resposta imune do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) / Fabiana Penalva de Melo. – Recife, 2016.
73 f. : il.

Orientador(a): Eudes de Souza Correia.
Tese (Doutorado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2016.
Inclui anexo(s) e referências.

1. *Litopenaeus vannamei* 2. Sobrevivência 3. Camarão
I. Correia, Eudes de Souza, orientador II. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

Efeito da toxicidade do nitrito sobre a sobrevivência, consumo alimentar e resposta imune do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

FABIANA PENALVA DE MELO

Tese defendida e julgada APROVADA pela Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, em 25/02/2016.

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia (Orientador)
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos (Membro externo)
Departamento de Oceanografia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes (Membro externo)
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes (Membro interno)
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. William Severi (Membro interno)
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

A minha Avó,
Nívea Oliveira Penalva
(In memoriam)

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural Pernambuco, pelo apoio para realização do Curso e ao Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE, em nome de todos os professores e funcionários, pela ótima acolhida nestes anos de convivência e excelente contribuição para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Pós-Graduação.

Ao estimado Professor Dr. Eudes de Souza Correia, que tanto contribuiu para minha formação, pela confiança, amizade, incentivo e exemplo profissional.

Aos membros da Banca Examinadora, titulares e suplentes, pelas críticas e sugestões que contribuíram para melhorar este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, principalmente a Paulo de Paula Mendes, Emiko Shinozaki Mendes, Maria Raquel Coimbra e Alfredo Olivera pela amizade, pelos conselhos e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Sistemas de Produção Aquícolas (LAPAQ), João Paulo Viana de Lima, Rafael Liano de Souza, Maria Gabriela Ferreira, Eduardo Cesar de Lima, Ítalo Felipe Mascena, Jaqueline Moura e Marcelo Franklin, pela amizade, companheirismo e ajuda durante o período de execução do experimento.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, pela agradável convivência, amizade, apoio e incentivo.

Aos meus pais Luzia Maria Barros e Edvaldo Melo, meus irmãos, Edvaldo Melo Júnior, Eduardo Henrique Penalva, Nívea Penalva Vasconcelos e Neiva Penalva. Aos meus sobrinhos, Ícaro de Melo, Júlia de Melo, Maria Eduarda de Melo, Caio de Melo, Artur de Melo e Joana de Melo.

E, principalmente, a Deus, que está sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Resumo

O acúmulo de substâncias tóxicas inorgânicas, como amônia e nitrito, é um dos principais problemas de qualidade da água em sistemas aquícolas intensivos. Muitas vezes, os níveis dos compostos nitrogenados, em sistemas aquícolas ou na natureza, excedem os valores da concentração letal - CL₅₀. No entanto, experimentos sobre a exposição sub-crônica/crônica a compostos nitrogenados sobre o crescimento e/ou taxas de alimentação de crustáceos são relativamente limitados. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito tóxico do nitrito sobre o crescimento, sobrevivência, consumo alimentar e quantidade de hemócitos do camarão *Litopenaeus vannamei* criado sob a tecnologia de bioflocos e em água clara. Para avaliar a toxicidade do nitrito sobre o crescimento, a sobrevivência e a quantidade de hemócitos totais na hemolinfa de juvenis do camarão *L. vannamei*, foram testadas quatro concentrações de nitrito (0, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹) em dois sistemas de cultivo – água clara e biofoco, durante 30 dias. A sobrevivência dos camarões foi influenciada negativamente ($P < 0,05$) pelo sistema de água clara. A interação entre as concentrações de N-nitrito e os sistemas de cultivo não influenciaram significativamente ($P \geq 0,05$) na quantidade total de hemócitos. Com base nos resultados obtidos verificou-se que, é possível cultivar o camarão *L. vannamei* com concentrações de até e 20 mg N-NO₂ L⁻¹ por um período de 30 dias, sem comprometer o crescimento e a sobrevivência. Para avaliar a toxicidade do nitrito sobre o crescimento, a sobrevivência e o consumo alimentar de juvenis do camarão *L. vannamei* cultivado em sistema de água clara, foram adotadas seis concentrações nominais de N-nitrito 0, 10, 20 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹. Após 30 dias de cultivo, o peso final (2,50-5,01 g), ganho de peso (0,01-2,51 g), taxa de crescimento específico (0,03-2,32 % dia⁻¹), sobrevivência (0,00-100 %), comprimento das antenas e o consumo alimentar dos camarões foram significativamente influenciados ($P < 0,05$) pelas concentrações mais elevadas de N-nitrito. Desta forma, é possível cultivar o camarão *L. vannamei* em concentrações de 10 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹ por um período de 30 dias sem comprometer a sobrevivência e o consumo alimentar.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, Sobrevivência, Consumo alimentar

Abstract

The accumulation of inorganic toxic substances such as ammonia and nitrite, is a major water quality problem in intensive aquaculture systems. Often the levels of nitrogen compounds in aquaculture systems or in the nature, exceed the values of LC_{50} , although, experiments on exposure subchronic/chronic nitrogenous compounds on the growth and/or feeding rates are relatively limited. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity of nitrite on survival, food consumption and immune response of *Litopenaeus vannamei* shrimp grown in the biofloc technology and clear water. To evaluate the toxicity of the nitrite on growth, survival and total amount of hemocytes in the hemolymph of *L. vannamei* juveniles. Four concentrations of nitrite (0, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹) were tested in two culture systems - clear water and biofloc for 30 days. Survival of shrimp was negatively influenced ($P < 0.05$) by clear water system. The interaction between the N-nitrite concentrations and culture systems did not affect significantly ($P \geq 0.05$) the total amount of hemocytes. Based on the results obtained, it is possible to culture the *L. vannamei* shrimp at concentrations of 10 and 20 mg N-NO₂ L⁻¹ for a period of 30 days without compromising growth and survival. To evaluate toxicity of the nitrite on growth, survival and juvenile shrimp *L. vannamei* feed consumption grown in clear water system six nominal concentrations of nitrite-N 0, 10, 20 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹ were adopted. After 30 days of culture, the final weight (from 2.50 to 5.01 g), weight gain (from 0.01 to 2.51 g), specific growth rate (from 0.03 to 2.32% day⁻¹), survival (0.00 to 100%), length of antennae and feed consumption of shrimps were significantly affected ($P < 0.05$) for higher N-nitrite concentrations of. Thus, it is possible to culture the *L. vannamei* shrimp at concentrations of 10 and 20 mg N-NO₂ L⁻¹ for a period of 30 days without affecting survival and feed consumption.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, Survival, Feed consumption.

Lista de figura

Lista de Figuras Artigo Científico II

- Figura 1. Sobrevivência média dos juvenis de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de N-nitrito. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). Tratamentos: C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80 correspondem a 0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹ 69
- Figura 2. Consumo de ração por juvenis de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de N-nitrito. Os dados são as médias±desvio padrão. Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais entre si ($P < 0,05$). Tratamentos: C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80 correspondem a 0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹ 70

Lista de tabelas

Lista de Tabelas Artigo Científico I

Tabela 1. Efeito das diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito e dos sistemas de cultivo sobre as variáveis de qualidade da água durante o período experimental (média±desvio padrão).....	35
Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito e dos sistemas de cultivo sobre o desempenho do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado durante 30 dias (média±desvio padrão).....	36
Tabela 3. Contagem total de hemócitos (CTH) dos camarões submetidos as diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito em dois sistemas de cultivo – água clara e biofoco (média±desvio padrão).....	37

Lista de Tabelas Artigo Científico II

Tabela 1. Efeito das diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito sobre as variáveis de qualidade da água durante o período experimental (média±desvio padrão).....	67
Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito sobre o desempenho do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado durante 30 dias (média±desvio padrão).....	68

Sumário

DEDICATÓRIA
AGRADECIMENTOS
RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Tecnologia de bioflocos (BFT).....	12
2.2. Compostos nitrogenados.....	14
2.3. Toxicidade.....	16
2.4. Toxicidade do nitrito.....	17
2.5. Sistema imunológico dos camarões.....	18
2.6. Consumo alimentar.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	29
5.1. Artigo Científico I - Toxicidade do nitrito no camarão cultivado em sistemas de água clara e bioflocos (<i>Boletim do Instituto de Pesca</i> , ISSN 0046-9939).....	30
5.1.1. Introdução.....	31
5.1.2. Material e Métodos.....	33
5.1.3. Resultados.....	35
5.1.4. Discussão.....	37
5.1.5. Conclusão.....	39
5.1.6. Agradecimentos.....	40
5.1.7. Referências.....	40
5.1.8. Anexo I – Normas da Revista.....	44
5.2. Artigo Científico II - efeito da toxicidade do nitrito sobre o consumo alimentar do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> (<i>Revista Ciência Rural</i> , ISSN Eletrônico 1678-4596).....	50
5.2.1. Introdução.....	52
5.2.2. Material e Métodos.....	54
5.2.3. Resultados e Discussão.....	56
5.1.5. Conclusão.....	62
5.1.6. Agradecimentos.....	62
5.1.7. Referências.....	62
5.1.8. Anexo II – Normas da Revista.....	71

1. INTRODUÇÃO

O cultivo superintensivo de peixes e camarões em sistema de bioflocos (BFT) se caracteriza por nenhuma ou limitada renovação de água, elevadas densidades de estocagem, intensa oxigenação ou aeração, controle da entrada de nutrientes e alimentos (CRAB et al., 2007; CRAB et al., 2009; DE SCHRYVER et al. 2008). Além disso, a tecnologia de bioflocos (BFT) se apresenta como uma alternativa para resolver problemas nutricionais e de biossegurança, uma vez que esse sistema tem como base a manipulação da comunidade microbiana através da adição de fontes de carbono que promovem o crescimento de bactérias heterotróficas (CRAB et al., 2007, CRAB et al., 2009). Essas bactérias se desenvolvem ao longo do cultivo e utilizam o carbono orgânico e o nitrogênio inorgânico da amônia para produzir biomassa na forma de partículas floculadas (biofoco), promovendo uma fonte suplementar de alimento para os camarões (DE SCHRYVER et al., 2008; AZIM e LITTLE, 2008, WASIELESKY et al., 2006; BURFORD et al., 2004). Essa suplementação pode melhorar a qualidade da água a partir da remoção da amônia tóxica (HARGREAVES, 2006; DE SCHRYVER et al., 2008).

As bactérias heterotróficas obtêm carbono e energia para o crescimento a partir de compostos orgânicos que existem na natureza, ao contrário das autotróficas que obtêm energia a partir da luz (fotoautotróficas) e a partir da oxidação de compostos inorgânicos, tais como a amônia e nitrito (quimioautotróficas). O processo de nitrificação é realizado em duas etapas, resultado da transformação da amônia (NH_3) em nitrito (NO_2) e este finalmente a nitrato (NO_3). Bactérias oxidantes da amônia (BOA) obtêm sua energia por catabolizar amônia não ionizada em nitrito e incluem bactérias do gênero *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosivibrio*. Bactérias oxidantes de nitrito (BON) oxidam nitrito em nitrato, e incluem bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, e *Nitrospina*. Bactérias nitrificantes são obrigatoriamente quimioautotróficas, e consomem o dióxido de carbono como a sua fonte primária de carbono inorgânico, e obrigatoriamente aeróbias, que requerem

oxigênio para crescer (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998; HAGOPIAN e RILEY, 1998). O processo de nitrificação fica incompleto quando ocorre uma baixa produtividade das bactérias oxidantes do nitrito (BON), ocasionando um aumento das concentrações de nitrito.

Entre os compostos nitrogenados tóxicos no sistema BFT, o nitrito merece uma atenção especial, pois pode ocorrer o acúmulo devido ao desequilíbrio nas taxas de nitrificação ou ao baixo aproveitamento deste composto pelas bactérias heterotróficas (PHILIPS et al., 2002; EBELING et al., 2006). Elevadas concentrações acarretam efeitos tóxicos aos camarões cultivados a curto e longo prazo, podendo afetar o crescimento e a sobrevivência dos animais, causando prejuízo na produção (VINATEA et al., 2010; LIN e CHEN, 2003).

O nitrito tem uma influência sobre diversas funções biológicas. Quando presente na água, nitrito é imediatamente incorporado na hemolinfa e no intestino médio de camarões através da absorção branquial, e se acumula nos tecidos (CHENG e CHEN, 1999). Estes pesquisadores sugerem que a captação de nitrito pelo camarão *Penaeus japonicus* resultou na redução de cloreto (Cl^-) e sódio (Na^+) nos níveis de preteína levando a uma diminuição da osmolalidade da hemolinfa. A exposição ao nitrito diminuiu significativamente a tolerância à temperatura para pós-larvas do camarão *Penaeus setiferus* (camarão branco) (ALCARAZ et al., 1997) e induziu alterações comportamentais e morfológicas em anfíbios (MARCO e BLAUSTEIN, 1999), como redução na atividade alimentícia, desequilíbrio, paralisia, anormalidades e eventualmente a morte (MARCO et al., 1999).

Com objetivo de evitar elevadas concentrações dos compostos nitrogenados atingissem níveis tóxicos no sistema de bioflocos, Otoshi et al. (2011) e Sesuk et al. (2009) analisaram o desenvolvimento prévio da comunidade bacteriana através da adição de compostos que podem servir como estimuladores do crescimento microbiano antes do início do cultivo, estabilizando assim, a população de microorganismos antes da estocagem dos animais.

Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar a influência de diferentes concentrações de nitrito sobre a sobrevivência, crescimento, consumo alimentar e resposta imune do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos e de água clara.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecnologia de bioflocos (BFT)

Com a intensificação da atividade de cultivo de organismos aquáticos vários problemas surgiram, entre estes a deterioração da qualidade da água causada pela alta concentração de metabólitos e a dependência de grandes trocas d'água (AVNIMELECH, 2007). A descarga d'água proveniente da aquicultura no ambiente natural contém nutrientes, compostos orgânicos e inorgânicos como amônia, fósforo, carbono orgânico dissolvido e matéria orgânica (PIEDRAHITA, 2003; SAMOCHA et al., 2007; MISHRA et al., 2008), que poderiam contribuir para impactar os corpos d'água adjacentes.

A água dos efluentes, oriunda de sistemas de produção intensivos é caracteristicamente rica em nutrientes, tais como nitrogênio, fósforo, material particulado orgânico e inorgânico e demanda de oxigênio (COHEN et al., 2005). A degradação ambiental reduz a produtividade e aumenta o estresse sobre os organismos cultivados deixando-os vulneráveis à doenças. Para minimizar a quantidade de nutrientes liberados nos ecossistemas costeiros e as perdas de produção causadas pelo surgimento de enfermidades, tem-se adotado atualmente sistemas de cultivo com limitada ou nenhuma troca d'água (SAMOCHA et al., 2007, MISHRA et al., 2008).

Nesse contexto, a tecnologia de bioflocos (BFT) se apresenta como uma alternativa para resolver problemas nutricionais e de biossegurança, uma vez que esse sistema tem como base a manipulação da comunidade microbiana através da adição de fontes de carbono que promovem o crescimento de bactérias heterotróficas (CRAB et al., 2007, CRAB et al., 2009). Essas bactérias se desenvolvem ao longo do cultivo e utilizam o carbono orgânico e o

nitrogênio inorgânico da amônia para produzir biomassa na forma de partículas floculadas (biofoco), promovendo uma fonte suplementar de alimento para os camarões (DE SCHRYVER et al., 2008, AZIM; LITTLE, 2008, WASIELESKY et al., 2006, BURFORD et al., 2004).

No sistema de cultivo BFT, é fundamental a utilização de técnicas e domínio da comunidade bacteriana heterotrófica através do balanceamento e manutenção de relações Carbono:Nitrogênio (C/N). O aporte de carbono nesses sistemas pode ocorrer através de fontes ricas em carbono orgânico (açúcares, amido, celulose, glucose, acetato, glicerol, etc) (HARI et al., 2006; DE SCHRYVER et al., 2008; AVNIMELECH, 2009) com destaque para o melaço de cana-de-açúcar, empregado como promotor de crescimento bacteriano em viveiros de cultivo no Brasil e no mundo (WASIELESKY et al., 2006).

As bactérias heterotróficas possuem a habilidade de sintetizar proteína a partir do carbono orgânico e da amônia. Entretanto, é essencial que a relação C/N seja adequada para utilização das bactérias. A correta manutenção da relação Carbono:Nitrogênio no desenvolvimento das bactérias heterotróficas em cultivos intensivos e semi-intensivos, resulta na conversão de compostos nitrogenados inorgânicos em células microbianas ricas em proteína (ASADUZZAMAN et al., 2008). O nitrogênio inorgânico é imobilizado em células bacterianas quando os substratos orgânicos têm uma alta relação C/N (AZIM et al., 2008; CHAMBERLAIN et al., 2001).

Entretanto, em sistemas de cultivo BFT as bactérias nitrificantes possuem maior eficiência na remoção do nitrogênio, porém levam maior tempo para metabolizar a amônia, devido à sua lenta taxa de crescimento (EBELING et al., 2006; HARGREAVES, 2006). Dessa forma, pode ocorrer um aumento nas concentrações de amônia, caso as bactérias heterotróficas não estejam presentes nas fases iniciais do cultivo, uma vez que as bactérias autotróficas possuem um crescimento mais lento a tendência é haver um acúmulo inicial deste composto. Além disso, se a via autotrófica chegar a dominar o sistema, a amônia pode ser

oxidada a nitrito, pelas Bactérias Oxidantes da Amônia (BOA), que em sua maioria pertencem aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*. Porém, as bactérias que fazem a oxidação do nitrito a nitrato (Bactérias Oxidantes do Nitrito - BON), que em sua maioria pertencem aos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*, possuem um crescimento mais demorado do que as BOA, levando a um acúmulo ainda maior de nitrito no sistema (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998; HAGOPIAN e RILEY, 1998).

2.2 Compostos nitrogenados

Amônia, nitrito e nitrato são componentes essenciais à sustentabilidade da vida para vários microrganismos aquáticos e, nos ecossistemas aquáticos, são as formas mais comuns de nitrogênio inorgânico dissolvido (ROMANO e ZENG, 2013). Entretanto, níveis excessivos podem afetar significativamente a abundância e as condições filogenéticas de vários animais aquáticos, incluindo os crustáceos.

Além disso, estes compostos são uma preocupação global e um fator limitante importante na indústria da carcinicultura, particularmente desde a tendência na aquicultura à um movimento em direção a sistemas de cultivo mais intensivos, com uma maior dependência de insumos para alimentação animal (BOUWMAN et al., 2011; FAO, 2011).

O acúmulo de substâncias tóxicas inorgânicas, como amônia e nitrito, é um dos principais problemas de qualidade da água em sistemas aquícolas intensivos (COLT e ARMSTRONG, 1981). Os organismos aquáticos, incluindo o camarão, excretam constantemente amônia, podendo ocorrer o acúmulo deste composto nitrogenado no cultivo. Caso essa substância não seja removida, altas concentrações de amônia nos sistemas reduzem o crescimento dos camarões, podendo até mesmo causar mortalidade (OSTRENSKY e WASIELESKY, 1995; EBELING et al. 2006).

A metabolização dos compostos nitrogenados tóxicos aos animais aquáticos é realizada por uma diversidade de microrganismos, porém as bactérias heterotróficas e autotróficas

nitrificantes parecem ter maior importância no sistema de biofilme, sendo as nitrificantes responsáveis pelo processo de nitrificação (EBELING et al., 2006; HARGREAVES, 2006). O processo de nitrificação é caracterizado por duas etapas, sendo a primeira responsável pela oxidação biológica da amônia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$) a nitrito (NO_2) e posteriormente a nitrato (NO_3), tendo o oxigênio como receptor final de elétrons (PHILIPS et al., 2002; EBELING et al., 2006), da seguinte forma:



Neste processo, a amônia é oxidada em nitrito (nitritação) através das bactérias oxidantes da amônia (BOA), pertencente aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*. As bactérias oxidantes do nitrito (BON) fazem a oxidação do nitrito a nitrato (nitratação), sendo a maioria delas pertencentes aos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*, entretanto estas últimas possuem um crescimento mais lento que as bactérias oxidantes da amônia, possivelmente levando a um maior acúmulo de nitrito no sistema (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998; HAGOPIAN e RILEY, 1998).

O nitrito é um importante produto intermediário no processo de nitrificação ou desnitrificação do nitrato no ciclo do nitrogênio (JENSEN, 2003, KROUPOVA et al., 2005). Dependendo das concentrações e do estágio de desenvolvimento do organismo aquático cultivado, pode vir a ser bastante tóxico, causando mortalidade em larviculturas e sistemas de cultivo (BROWNELL, 1980).

2.3 Toxicidade

Testes de toxicidade aguda representam um método padrão para quantificar e comparar toxicidades relativas dos poluentes e é determinada pela concentração que mata 50% dos organismos testados, o chamado valor de LC_{50} (APHA, 1985). Utilizando a análise probítica, valores de LC_{50} são geralmente apresentados após 12 e/ou 24 horas de exposição ao poluente,

e até 96 horas, ou mais. Além de fornecer dados comparáveis a outras espécies ou poluentes, estes valores são particularmente úteis quando se examina as relações entre o tóxico e outras variáveis bióticas ou abióticas. Sabe-se que a amônia-N, geralmente apresenta valores de LC_{50} inferiores a outros compostos nitrogenados como nitrito-N e nitrato-N e, portanto o mais tóxico (CHEN e LEI, 1990; CHEN et al, 1990a,b).

Muitas vezes os níveis dos nitrogenados, em sistemas aquícolas ou na natureza, excedem os valores do LC_{50} . No entanto, experimentos sobre a exposição sub-crônica/crônica à compostos nitrogenados sobre o crescimento e/ou taxas de alimentação de crustáceos são relativamente limitadas. Além disso, valores de LC_{50} muitas vezes são usados para calcular concentrações “seguras” pela multiplicação dos valores do LC_{50} de 96 horas por um valor empírico de 0,1, que é então utilizada para prever a concentração que não é apenas o não letal, mas permite ao animal suportar (SPRAGUE, 1971).

No entanto, evidências indicam que tais concentrações "seguras" de amônia-N e nitrito-N são uma sobreavaliação. Além disso, vários experimentos de laboratório que analisam pontos estressores, como a troca gasosa, equilíbrio ácido/base, respostas imunológicas, osmorregulação e histopatologia, muitas vezes revelam significativas interrupções/alterações em concentrações relativamente baixas. Portanto, investigações sobre exposições subletais ou medidas de incorporação fisiológicas durante os testes de toxicidade aguda podem fornecer informações mais importantes e abrangentes, sobretudo para avaliações de risco ambiental e gestão de aquicultura (DAHL et al., 2006).

2.4 Toxicidade do nitrito

Entre os principais efeitos tóxicos do nitrito destacam-se aqueles que tem uma relação direta sobre o transporte de oxigênio, oxidação de importantes compostos e danos aos tecidos (FRIAS-ESPERICUETA e PAÉZ-OSUNA, 2001). Os crustáceos contêm hemocianina no lugar da hemoglobina (pigmento respiratório dos peixes) que muda para metahemoglobina na presença de nitrito e provoca hipóxia e cianose. De acordo com Wickins (1976), esta mesma

reação pode ocorrer na hemocianina dos camarões. O mecanismo de toxicidade do nitrito atua sobre o transporte de oxigênio, ou seja, o nitrito se liga à hemocianina, ocupando o lugar do oxigênio, transformando a hemocianina em metahemocianina, a qual é incapaz de transferir oxigênio para os tecidos do animal. Dessa forma, ocorre uma redução na quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo (TAHON et al., 1988), podendo ocorrer hipóxia e conseqüentemente mortalidade dos organismos cultivados (CHEN et al., 1986).

De acordo com Cheng e Chen (1999), a presença do nitrito na hemolinfa do camarão *Penaeus monodon*, provoca um aumento da pressão parcial do oxigênio (pO_2) sugerindo um decréscimo da oxihemocianina (hemocianina ligada ao oxigênio). Chen e Cheng (1995) observaram que os níveis de oxihemocianina e da proteína na hemolinfa de *P. japonicus* reduziram, após a exposição ao nitrito. Isto sugere que o nitrito acumulado no hemolinfa perturba o metabolismo normal do nitrogênio e do sistema respiratório. Eles concluíram ainda que em camarões peneídeos expostos ao nitrito, a hemocianina simplesmente não é oxigenada nas brânquias.

Tseng e Chen (2004) examinaram os efeitos do estresse ao nitrito no camarão *Litopenaeus vannamei* na resposta imune ao *Vibrio alginolyticus*. Eles detectaram que o camarão exposto a concentrações de 5 a 22 mg N-NO₂/L apresentaram resistência significativamente reduzida à infecção bacteriana. Este estudo foi realizado por meio de análises da contagem de hemócitos (células vermelhas do sangue dos invertebrados).

2.5 Sistema imunológico dos camarões

O sistema imune dos crustáceos é constituído principalmente pela hemolinfa. Esta é caracterizada por se constituir em um tecido fluido de coloração azul-esverdeada, e capaz de atingir diretamente todos os tecidos dos crustáceos (MALDONADO et al., 2004), composta por uma fração celular, os hemócitos, e uma fração líquida, o plasma (PERAZZOLO, 1994). Dentre as funções dos hemócitos estão a resposta inflamatória de defesa contra agentes externos e de coagulação (BARBIERI e OSTRENSKY, 2002). Em relação à oxigenação, a

hemocianina é a proteína respiratória responsável pelo transporte de oxigênio, constituindo 60-95% da proteína total do plasma (MALDONADO et al., 2004).

Atualmente, são descritos três tipos de hemócitos para os crustáceos: hemócitos hialinos (HH), hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos granulares ou com grânulos grandes (HGG) (MAGGIONI et al., 2004; LE MOULLAC e HAFFNER, 2000; SRITUNYALUCKSANA e SÖDERHÄLL, 2000). De maneira geral, os HH dos crustáceos são usualmente descritos como os menores hemócitos, com uma alta relação núcleo-citoplasma contendo nenhum ou poucos grânulos. Já os hemócitos granulares (HGP e HGG) são descritos como células de citoplasma mais abundante e muito rico em grânulos de diversos tamanhos e conteúdos. Os HGP seriam formas intermediárias que podem amadurecer e se transformar em HGG. De acordo com alguns autores, os HH pertenceriam a uma linhagem celular distinta dos hemócitos granulares e estariam essencialmente relacionados aos mecanismos de coagulação. Já os hemócitos granulares estariam principalmente envolvidos na fagocitose de microrganismos, na formação de nódulos e cápsulas e na produção de moléculas tóxicas e microbicidas capazes de lisar e/ou degradar os patógenos invasores (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

A contagem total de hemócitos (CTH) é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o estado de saúde dos camarões (CHENG e CHEN, 2001). Ela consiste na contagem total de hemócitos presentes num determinado volume de hemolinfa, facilmente realizada em hemocítômetro ou câmara de Neubauer. A CTH pode variar em resposta ao estresse ambiental, atividade endócrina, ciclo de muda e infecções virais ou bacterianas (JOHANSSON, 2000; JIRAVANICHPAISAL et al., 2006).

Estudos têm demonstrado alterações na CTH nas mais diversas condições físico-químicas e biológicas em crustáceos, como situações de hipóxia (Le MOULLAC et al., 1998), baixa temperatura (Le MOULLAC e HAFFNER, 2000), baixa salinidade (HENNING et al. 1999; PERAZZOLO et al., 2002), estágio de muda (TSING et al., 1989), aclimação em

cativeiro (SÀNCHEZ et al., 2001), presença de xenobiontes (SMITH e JOHNSTON, 1992; SMITH, 1996) e infecções (SMITH e SODERHALL, 1983; MARTIN et al., 1993; HAUTON et al., 1997; HENNIG et al., 1998; RENGPIPAT et al., 2000). Vários autores concordam que um aumento da CTH poderia conferir maior proteção contra doenças em crustáceos decápodes (TRUSCOTT e WHITE, 1990; Le MOULLAC et al., 1998; Le MOULLAC e HAFFNER, 2000).

Com relação aos efeitos tóxicos do nitrito sobre a hemolinfa dos crustáceos, Jensen (1990) ao submeter o crustáceo *Astacus astacus* à diferentes concentrações de nitrito, relatou que a hemocianina diminuiu e a concentração de nitrito na hemolinfa aumentou com o tempo de exposição. No entanto, Chen e Chen (1992) verificaram que o camarão *Penaeus japonicus* exposto ao ambiente com nitrito, este foi facilmente incorporado a hemolinfa do camarão e reduziu a concentração de hemocianina.

2.6 Consumo alimentar

Nos últimos anos, mudanças significativas nas operações de manejo de camarões cultivados, estão sendo atribuídas, principalmente, a avanços tecnológicos, elevada demanda de mercado e redução dos estoques selvagens (SAMOCHA et al., 2004; SAMOCHA, 2009). Essas mudanças estão relacionadas a procedimentos de manejo em resposta a surtos de doenças virais e a preocupação sobre o efeito de efluentes (LIGHTNER, 1999; LeMOULLAC, 2000). O manejo dos sistemas de produção de camarão (viveiros, tanques, raceways) deve ser integral e incluir o manejo alimentar como um dos componentes mais importantes. O manejo dos sistemas de produção requer uma compreensão de aspectos biológicos das espécies-alvo, de processos químicos e biológicos que controlam a qualidade da água e o monitoramento do contínuo dos sistemas.

O conceito de manejo alimentar envolve o alimento utilizado, quando, quanto e como alimentar, e como avaliar e ajustar as práticas de manejo (JORY, 1995). O manejo alimentar é

um aspecto fundamental para alcançar o máximo de crescimento com menor entrada de alimento durante o cultivo do camarão. Além disso, práticas de manejo alimentar inadequadas têm sido associadas à doenças e problemas relacionados com a qualidade da água resultantes da produção sub-ótima (JORY, 1995; JORY et al., 2001).

O comportamento alimentar dos camarões está associado a vários fatores incluindo, espécie, idade, tamanho, disponibilidade de alimento natural, intensidade da luz, atividade de muda, qualidade do alimento utilizado, tamanho do pélete da ração, dispersão na alimentação, composição da ração e palatabilidade e variações na qualidade da água entre outros (NUNES e PARSONS, 2000; JORY et al., 2001).

Diversos estudos mostram como as variações da qualidade da água influenciam o comportamento dos camarões. Santos et al. (2000) observaram um efeito inibitório na atividade de predação do *Farfantepenaeus paulensis* quando expostos a ambientes fechados contaminados com amônia e metais pesados. Robertson et al. (1993) registraram baixo crescimento do *L. vannamei* em altas salinidades, com redução no consumo alimentar, enquanto Wyban et al. (1995) trabalhando com a mesma espécie registraram mudanças significantes na ingestão de alimentos e no fator de conversão alimentar em baixas temperaturas. Wasielesky et al. (2003) reportaram variações significantes no consumo alimentar de juvenis de *F. paulensis* em uma função dos diferentes parâmetros físico-químicos da água (temperatura, salinidade, amônia, nitrito e nitrato).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito tóxico do nitrito sobre o crescimento, sobrevivência, consumo alimentar e resposta imune do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema de bioflocos e água clara.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a toxicidade crônica do nitrito em juvenis de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos e água clara;
- Avaliar o efeito tóxico do nitrito sobre a quantidade de hemócitos dos camarões;

- Avaliar o consumo alimentar dos camarões submetidos à toxicidade do nitrito em sistema de água clara.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Public Health Association (APHA) 1995 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. APHA, Washington, DC, USA. 1995. 1082 p.

ALCARAZ, G.; CHIAPPA-CARRARA, X.; VANEGAS, C. Temperature tolerance of *Fenaeus setiferus* postlarvae exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology*. v.39, n. 3-4, p.:345-353, 1997.

AVNIMELECH, Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, v.264, p.140–147, 2007.

AVNIMELECH, Y. Biofloc technology – A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, LA, United States, 182 p., 2009.

ASADUZZAMAN, M., WAHAB, M.A., VERDEGEM, M.C.J., HUQUE, S., SALAM, M.A., AZIM, M.E. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production ponds. *Aquaculture*. 280:117-123, 2008.

AZIM, M.E., LITTLE, D.C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v.283, p.29–35, 2008.

- BARBIERY, R.C., OSTRENSKY, A.N. Reprodução, maturação e larvicultura. Camarões marinhos. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2002. V.1, 258p.
- BARRACCO, M.A., PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. Inmunologia en camarones - Capítulo 6. In: MORALES, V e CUELLAR-ANGEL J. (Eds). Guía Práctica de Inmunología y Patología del Camarón. Ed. CYTED, pp. 169 – 224. 2008.
- BOUWMAN, A.F., PAWLOWSKI, M., LIU, C., BEUSEN, A.H.W., SHUMWAY, S. E., GILBERT, P.M., OVERBEEK, C.C. Global hindcasts and future projections of coastal nitrogen and phosphorous loads due to shellfish and seaweed aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, v.19, p. 331–357, 2011.
- BURFORD, M.A. et al. The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp *Penaeus monodon* in outdoor tanks. *Aquaculture Nutrition*. v.10, p.15-23, 2004.
- BROWNELL, C.L. Water quality requirements for first feeding in marine fish larvae: ammonia, nitrite and nitrate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.44, p.269-283, 1980.
- CHABERLAIN, G.; AVNIMELECH, Y.; McINTOSH, R. P.; VELASCO, M. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N - I: Nutrient transformation and water quality benefits. *The Global Aquaculture Advocate*, p. 53-56, 2001.
- CHEN, J.C., CHEN, S.F. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*. v.109, p.177-185, 1992.
- CHEN, J.C., LEI, S.C. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon*. *J Journal of the World Aquaculture Society*, v. 21, p.300–306, 1990.
- CHEN, J.C., LIU, P.C., LEI, S.C. Toxicities of ammonia and nitrite to PENAEUS MONODON adolescents. *Aquaculture*, v.89, p.127–137, 1990a.
- CHEN, J.C., TING, Y.Y., LIN, J.N., LIN, M.N. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Marine Biology*, v.107, p.427–431, 1990b.
- CHEN, J.C.; CHENG, S.Y. Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Aquatic Toxicology*, v.33, p. 215-26, 1995.
- CHEN, J.C., CHIN, C.K., LEE, C.K. Effects of ammonia and nitrite on larval development of the shrimp *Penaeus monodon*. *The First Asian Fisheries Forum*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines 657-662, 1986.
- CHENG, S.Y., CHEN, J.C. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology*, v.45, n.1, p.35-46, 1999.
- CHENG, W., CHEN, J.C. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the hemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*. v.11, n.1, p.53–63, 2001.
- COHEN, J.M., SAMOCHA, T.M., FOX, J.M., GANDY, R.L., LAWRENCE, A.L. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquaculture*, v.32, p. 425-442, 2005.

- COLT, J.E.; ARMSTRONG, D.A. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. In: ALLEN, LJ, EC KINNEY. (eds.) Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture Section, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 34-47.
- CRAB, R. et al. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*. v.270, p.1-14. 2007.
- CRAB, R. et al. Bioflocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering*. 40, 105–112, 2009.
- DAHL, U., GOROKHOVA, E., BREITHOLTZ, M. Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology*, v.77, p.433–438, 2006.
- DE SCHRYVER, P. et al. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*. v.277, p.125-137, 2008.
- EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., BISOGNI, J.J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, v. 257, p. 346-358, 2006.
- FAO (Food Agriculture Organization of the United Nations). Aqua-culture topics and activities. Trends in aquaculture production. Text by Alan Lowther and Stefania Vannuccini. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department . Rome: FAO (2011).
- FRÍAS-ESPERICUETA, M.G., PAÉZ-OSUNA, F. Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones, In PAÉZ-OSUNA, F. (ed.). Camaronicultura y Medio Ambiente. El Colegio de Sonora, Mazatlán, Sinaloa, México. p. 253-276, 2001.
- HAGOPIAN, D.S., RILEY, J.G. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, v. 18, p. 223-244, 1998.
- HAUTON, C., WILLIAMS, J.A., HAWKINS, E. The effects of live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *carcinus maenas* (L.). *Journal Experimental marine Biology and Ecology*. v.211, p.115-129, 1997.
- HARGREAVES, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 34,344–363.
- HARI, B.; MADHUSOODANA KURUP, B.; VARGHESE, J.T.; SCHRAMA, J.W.; VERDEGEM, M.C.J. Improved sustainability in extensive shrimp culture systems: control of carbon nitrogen ratio through addition of carbohydrate to the pond. *Aquaculture*, v.241, p.179-194, 2004.
- HENNIG, O., ITAMI, T., MAEDA, M., KONDO, M., NATUSKARI, Y., TAKAHASHI, Y. Analyses of haemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid Rod-shaped DNA virus. *Fish Pathology*. v.33, p.389-393, 1998.
- JENSEN, F. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.135, p. 9–24, 2003.
- JIRAVANICHPAISAL, P., LEE, B.L., SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. v.211 p, 213–36. 2006.

- JOHANSSON, M.W., KEYSER, P., SRITUNYALUKS, ANA, K., SÖDERHÄLL, K. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. v. 191, p.45–52, 2000.
- JORY, D.E. Feeding management practices for a healthy pond environment. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Aquaculture '95. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, 1–4 February. World Aquaculture Society, San Diego, USA, pp. 118 – 143, 1995.
- JORY, D.E.; CABRERAS, R.T.; DURWOOD, M.D.; FEGAN, D.; LEE, G.P.; LAWRENCE, A.L.; JACKSON, J.C.; MCINTOSH, P.R.; CASTANEDA, A.J. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. *Aquaculture*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, 2001.
- KROUPOVA, H., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z. Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina – Czech*, v.50, n.11, p.461–471, 2005.
- Le MOULLAC, G., HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191: p. 121-131, 2000.
- Le MOULLAC, G., SOYEZ, C., SAULNIER, D., ANSQUER, D., AVARRE, J.C., LEVY, P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology*. v.8, p.621-629, 1998.
- LIN, Y.C.; CHEN, J.C. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, v.224, n.1-4, p.193-201, 2003.
- MAGGIONI, D.S., ANDREATTA, E.R., HERMES, E.M., BARRACCO, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture*, v.241, p.501 – 515, 2004.
- MALDONADO, M., RODRÍGUEZ, J., BLAS, I. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista AquaTIC*, v.21, p.78-91, 2004.
- MARCO, A.; BLAUSTEIN, A.R. The effects of nitrite on the behavior and metamorphosis in cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.18, n.5, p.946–949, 1999.
- MARCO, A.; QUILCHANO, C.; BLAUSTEIN, A.R. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific northwest, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.18, n.12, p.2836–2839, 1999.
- MARTIN, G.G., POOLE, D., HOSE, J.E., REINOLDS, L., McKRELL, N., WHANG, A. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Journal Invertebrate Pathology*. v.62, p.308-315, 1993.
- MISHRA, J.K. et al. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacultural Engineering*. v.38, p.2-15, 2008.
- NUNES, A.J.P.; PARSONS, G.J. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture*, v.187, p.133-151. 2000.
- OSTRENSKY, A. e WASIELESKY, W. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the são paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, *Aquaculture*. v.132, p.339-347, 1995.

- OTOSHI, C.; RODRIGUEZ, N.; MOSS, S. Establishing nitrifying bacteria in super intensive biofloc shrimp production. *Global Aquaculture Advocate*, v.14, n.4, p.24-26, 2011.
- PERAZZOLO, L.M., GARGIONI, R., OGLIARI, P., BARRACO, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental or physiological stress. *Aquaculture*, v.214, p.19-33, 2002.
- PHILIPS, S., LAANBROCK, H. J., VERSTRAETE, W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. A review. *Rev. Environ. Sci. Biotech.*, v.1, p.115–141, 2002.
- PIEDRAHITA, R.H. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, v.226, p. 35–44, 2003.
- RENGPIPAT, S., RUKPRATANPORN, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASVETA, P. Immunity enhancement in Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by probiont bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture*, v.191, p.271-288, 2000.
- ROBERTSON, L., LAWRENCE, A.L., CASTILLE, F. Interaction and salinity and feed protein levels on growth of *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture*, v.2, n.1, 43-54, 1993.
- ROMANO, N., ZENG, C. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, v.21, n.1, p.1–21, 2013.
- SAMOCHA, T.M. Advances in shrimp nursery technologies. In: BROWDY, C.L. e JORY, D.E. (Eds.). *The rising tide, Proceedings of session on sustainable shrimp Farming*, World Aquaculture Society 2009, Baton Rouge, Louisiana USA, 2009, p.195-208.
- SAMOCHA, T.M.; PATNAIK, S.; GANDY, R.L. Heterotrophic intensification of pond shrimp production. In: *The fifth international conference of recirculating aquaculture*, 2004. Virginia. Anais. 22–25 July 2004, Roanoke, Virginia, USA.
- SAMOCHA, T. M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; ALI, A. M.; BURGER, J. M.; ALMEIDA, R. V.; AYUB, Z.; HARISANTO, M.; HOROWITZ, A.; BROCK, D. L., Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, v.36, p.184-191, 2007.
- SÀNCHEZ, A., PASCUAL, C., SÀNCHEZ, A., VARGAS-ALBORES, F., Le MOULLAC, G., ROSAS, C. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus vannamei* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, v.198, p.13-28, 2001.
- SANTOS, M.H.S., CUNHA, N.T. BIANCHINI, A. Effects of copper and zinc on growth, feeding and oxygen consumption of *Farfantepenaeus paulensis* post larvae (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.247, n.2, 233-242, 2000.
- SESUK, T.; POWTONGSOOK, S.; NOOTONG, K. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresource Technology*, v.100, n.6, p.2088-2094, 2009.
- SMITH, P.T. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). *Toxicon*, v.34, p.857-869, 1996.

- SMITH, V.J., JOHNSTON, P.A. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comparative biochemistry Physiology*. v.101C, p.641-649, 1992.
- SMITH, V.J., SODERHALL, K. B-1,3-glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *Biological Bulletin*. v.164, p.299-314, 1983.
- SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish-III. Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Research*, v.5, p.245-266, 1971.
- SRITUNYALUCKSANA, K., SODERHALL, K., The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*. v.191, n. 3-4, p.53-69, 2000.
- TAHON, J.P., HOOF, D V., VINCKIER, C., WITTERS, R., LEY, M., LONHE, R. The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *The Biochemical Journal* v.249, p.233-242, 1988.
- TRUSCOTT, R., WHITE, K.N., The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology*. v.4, p.455-461, 1990.
- TSENG, I.T., CHEN, J.C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology*, v.17, p.325-333, 2004.
- TSING, A., ARCIER, J.M., BRÉHÉLIN, M. Haemocytes of penaeids and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*. v.53, p.64-77, 1989.
- VAN LOOSDRECHT., M.C.M., JETTEN, M.S.M Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, v.38, p.1-7, 1998.
- VINATEA, L.; GÁLVEZ, A.O.; BROWDY, C.L.; STOKES, A.; VENERO, J.; HAVEMAN, J.; LEWIS, B.L.; LAWSON, A.; SCHULER, A.; LEFFLER, J.W. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*. v.42, n.1, p.17-24, 2010.
- WASIELESKY JR, W., BIACHINI, A., SANCHEZ, C.C., POERSCH, L.H. The effect of temperature, salinity and nitrogen products on food consumption of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v.48, n.1, 135-141, 2003.
- WASIELESKY, W. JR. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture, Amsterdam*, v.258, p.396-403, 2006.
- WICKINS, J.F. The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture*, v.9, p.19-37, 1976.
- WYBAN, J.; WALSH, W.A.; GODIN, D.M. Temperature effects on growth, feeding rate and conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. v.138, n.1-4, p.267-279, 1995.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo Científico I

TOXICIDADE DO NITRITO PARA O CAMARÃO CULTIVADO EM SISTEMAS DE ÁGUA CLARA E BIOFLOCOS

Fabiana Penalva de Melo; Maria Gabriela Padilha Ferreira;
Ítalo Felipe Mascena Braga; Eudes de Souza Correia

Manuscrito a ser submetido à revista

Boletim do Instituto de Pesca, ISSN 0046-9939.

TOXICIDADE DO NITRITO PARA O CAMARÃO CULTIVADO EM SISTEMAS DE ÁGUA CLARA E BIOFLOCOS

Fabiana Penalva de MELO¹; Maria Gabriela Padilha FERREIRA¹; Ítalo Felipe Mascena BRAGA¹; Eudes de Souza CORREIA¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola (LAPAQ), 52171-900, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a toxicidade do nitrito sobre o crescimento, a sobrevivência e a quantidade de hemócitos totais na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (1,60±0,06 g) cultivado em sistemas de água clara e bioflocos. Foram testadas quatro concentrações de nitrito (0, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹) nos dois sistemas de cultivo – água clara e bioflocos, durante 30 dias. O peso final (1,71-3,36 g) e a taxa de crescimento específico (0,27-2,43 % dia⁻¹) foram significativamente influenciados (P<0,05) pelas concentrações de N-nitrito e pelos sistemas de cultivo. A sobrevivência dos camarões foi influenciada negativamente (P<0,05) pelo sistema de água clara. A interação entre as concentrações de N-nitrito e os sistemas de cultivo não influenciaram significativamente (P≥0,05) a quantidade total de hemócitos. Desta forma, é possível cultivar o camarão *L. vannamei* em concentrações de 10 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹ por um período de 30 dias sem comprometer o crescimento e a sobrevivência.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*; toxicidade subcrônica; hemócitos.

TOXICITY OF NITRITE ON SHRIMP REARED IN CLEAR WATER AND BIOFLOC SYSTEMS

ABSTRACT

The aimed to evaluate the toxicity of N-nitrite on growth, survival and the amount of total hemocytes in the hemolymph shrimp *Litopenaeus vannamei* shrimp (1.60 ± 0.06 g) reared in clear water system and bioflocs. Four nitrite concentrations were tested (0, 10, 20 and 40 mg N-NO₂ L⁻¹) and two culture systems - clear water and biofloc for 30 days. The final weight (1.71 to 3.36 g) and the specific growth rate (0.27 to 2.43% day⁻¹) were significantly influenced ($P < 0.05$) by N-nitrite concentrations and culture systems. Survival of shrimp was significantly influenced ($P < 0.05$) by clear water system. The interaction between the N-nitrite concentrations and culture systems did not affect significantly ($P \geq 0.05$) the total amount of hemocytes. Thus, it is possible to culture the *L. vannamei* shrimp at concentrations of 10 and 20 mg N-NO₂ L⁻¹ for a period of 30 days without compromising growth and survival.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; toxicity subchronic; hemocyte.

INTRODUÇÃO

O acúmulo de substâncias tóxicas inorgânicas, como amônia e nitrito, é um dos principais problemas de qualidade da água em sistemas aquícolas intensivos (COLT e ARMSTRONG, 1981). O nitrito é um importante produto intermediário no processo de nitrificação ou desnitrificação do nitrato, no ciclo do nitrogênio (JENSEN, 2003, KROUPOVA et al., 2005). Dependendo das concentrações e do estágio de desenvolvimento do organismo aquático cultivado, pode vir a ser bastante tóxico, causando mortalidade em larviculturas e sistemas de cultivo (BROWNELL, 1980).

Entre os principais efeitos tóxicos do nitrito, destacam-se aqueles que tem relação direta com o transporte de oxigênio, com a oxidação de importantes compostos e a possibilidade de ocasionar danos aos tecidos (FRIAS-ESPERICUETA e PAÉZ-OSUNA, 2001). O mecanismo toxico do nitrito atua sobre o transporte de oxigênio, no qual o nitrito se liga à hemocianina, ocupando o lugar do oxigênio, transformando-a em metahemocianina, a qual é incapaz de transferir oxigênio para os tecidos. Dessa forma, ocorre uma redução na quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo (TAHON et al., 1988), podendo ocorrer hipóxia e consequentemente, morte dos organismos cultivados (CHEN et al., 1986).

A tecnologia de bioflocos (BFT) se apresenta como uma alternativa para resolver problemas nutricionais e de biossegurança, uma vez que esse sistema tem como base a manipulação da comunidade microbiana através da adição de fontes de carbono que promovam o crescimento de bactérias heterotróficas (CRAB et al., 2007, CRAB et al., 2009). O desenvolvimento das bactérias heterotróficas em cultivos intensivos e semi-intensivos resulta na conversão de compostos nitrogenados inorgânicos em células microbianas ricas em proteína (ASADUZZAMAN et al., 2008). O nitrogênio inorgânico é imobilizado em células bacterianas quando os substratos orgânicos têm uma alta relação C/N (AZIM et al., 2008; CHAMBERLAIN et al., 2001).

Em sistemas de cultivo com tecnologia de bioflocos (BFT), as bactérias nitrificantes possuem maior eficiência na remoção do nitrogênio, porém levam maior tempo para metabolizar a amônia, devido à sua lenta taxa de crescimento (EBELING et al., 2006; HARGREAVES, 2006). Dessa forma, pode ocorrer um aumento nas concentrações de amônia, caso as bactérias heterotróficas não estejam presentes nas fases iniciais do cultivo, uma vez que as bactérias autotróficas possuem um crescimento mais lento, onde a tendência é haver um acúmulo inicial deste composto. Além disso, se a via autotrófica pode chegar a dominar o sistema, a amônia pode ser oxidada a nitrito, pelas Bactérias Oxidantes da Amônia - BOA (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*). Porém, as bactérias que oxidam o nitrito a nitrato (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*), possuem um crescimento mais demorado do que as BOA, levando a um acúmulo ainda maior de nitrito no sistema (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998; HAGOPIAN e RILEY, 1998).

Cheng e Chen (1999) verificaram que a presença do nitrito na hemolinfa do camarão *Penaeus monodon* provocou um aumento da pressão parcial do oxigênio (pO_2) sugerindo um decréscimo da oxihemocianina (hemocianina ligada ao oxigênio). Chen e Cheng (1995) observaram que os níveis de oxihemocianina e da proteína na hemolinfa de *P. japonicus* reduziram após à exposição ao nitrito. Isto sugere que o nitrito acumulado na hemolinfa perturba o metabolismo normal do nitrogênio e do sistema respiratório. Eles concluíram

ainda que em camarões peneídeos expostos ao nitrito, a hemocianina simplesmente não é oxigenada nas brânquias. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade crônica do nitrito em sistema de água clara e bioflocos sobre o crescimento, sobrevivência e quantidade de hemócitos totais na hemolinfa de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistemas de água clara e bioflocos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e condições experimentais

O estudo experimental foi realizado na Estação de Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil. O estudo foi desenvolvido em 24 tanques de polietileno com área de 0,20 m² e volume útil de 30 L cada, providos de sistema de aeração individual e contínuo, mantidos por meio de um compressor radial de 2 CV.

Desenho experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com um arranjo fatorial 4 x 2, e foi aplicado para avaliar as concentrações de nitrito (0, 10, 20 40 mg N-NO₂ L⁻¹) e os sistemas de cultivo - água clara e bioflocos, constando de três repetições para cada tratamento. Para avaliar o efeito tóxico do nitrito foram utilizados juvenis de *Litopenaeus vannamei*, com peso médio de 1,60±0,06 g, estocados aleatoriamente nas unidades experimentais, numa densidade de 75 camarões m⁻² (15 camarões tanque⁻¹) e criados por um período de 30 dias. Os tratamentos com água clara foram denominados de 'A-0', 'A-10', 'A-20' e 'A-40', enquanto os tratamentos com bioflocos foram referidos como 'B-0', 'B-10', 'B-20' e 'B-40'.

Solução teste e manejo dos tanques

As concentrações experimentais foram obtidas por meio de solução estoque de N-nitrito, preparada a partir da dissolução de 49,24 g nitrito de sódio P.A. em 1 L de água destilada, para se obter uma concentração de 10.000 mg N-NO₂ L⁻¹. Para manter as concentrações experimentais de nitrogênio do nitrito, o volume útil dos tanques (100%) foi renovado a cada três dias, e as soluções de N-nitrito adicionadas novamente para

manutenção das concentrações experimentais. Diariamente, foi realizado o sifonamento das sobras de alimento e outros resíduos orgânicos nos tanques experimentais.

No tratamento com bioflocos, os tanques foram abastecidos com uma mistura de 50% água clara e 50% água de bioflocos oriunda de um cultivo de camarões com BFT em desenvolvimento na Estação de Aquicultura. Durante o período experimental, não foi necessário o uso de melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico, porque os níveis de nitrogênio da amônia total foram inferiores a 1 mg NAT L⁻¹.

Os animais foram alimentados com ração comercial peletizada contendo 35% proteína bruta, fornecida em bandejas, uma vez ao dia (9:00 horas) durante 30 dias de cultivo. A taxa de alimentação foi inicialmente estabelecida de acordo com Jory et al. (2001). Semanalmente, foram realizadas biometrias com amostras equivalentes a 40% da população de cada parcela experimental. O desempenho zootécnico dos camarões foi acompanhado através do peso inicial (g), peso final (g), taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) e ao final do cultivo foi avaliado a sobrevivência (S%) dos camarões.

Contagem total de hemócitos

Durante o período experimental, um camarão de cada unidade experimental foi coletado para contagem total de hemócitos (CTH), a cada cinco dias a contar da estocagem até o final do experimento. A hemolinfa foi retirada da região ventral do hemocelo, no início do primeiro segmento abdominal de cada animal. Para determinar a CTH, a hemolinfa de cada camarão foi coletada utilizando de 1 mL diretamente de uma solução anticoagulante na proporção de 1:4 (solução de Alsever modificado: citrato de sódio 27 mM, 336 mM cloreto de sódio, glucose 115 mM, EDTA a 9 mM, pH 7,0) (MAGGIONI et al., 2004). O material foi colocado individualmente em microtubos e mantidos sob refrigeração (HENNIG et al., 1998). A contagem total de hemócitos foi determinada, individualmente, utilizando-se uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico comum, seguindo o método utilizado na contagem de células sanguíneas humanas.

Parâmetros de qualidade da água

Durante o período experimental, a temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade da água foram verificados em cada tanque, duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h), com a utilização de multiparâmetro YSI 556 MPS (YSI Incorporation, Ohio, USA). A cada três dias foram coletadas amostras de água de cada tanque para determinação das concentrações de nitrogênio da amônia total (TAN) e nitrogênio do nitrito (N-NO₂). Previamente às análises, as amostras foram filtradas utilizando filtro analítico de 0,45 µm. Os compostos nitrogenados

foram mensurados utilizando os métodos HACH TNT 830 (método salicilato), 8507 (método de diazotização) para TAN e N-NO₂, respectivamente. As amostras foram lidas através de espectrofotômetro digital Hach DR 2800 (Hach Company, Colorado, USA).

Análise dos dados

As variáveis de crescimento dos camarões (peso inicial, peso final, sobrevivência, taxa de crescimento específico), a contagem de hemócitos e os parâmetros de qualidade da água foram analisadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA), para determinar o efeito das concentrações de nitrito (0, 10, 20, 40 mg N-NO₂ L⁻¹) e sua interação com o sistema de cultivo, água clara x biofoco, ao nível de significância de 5%. Os dados de sobrevivência foram transformados por meio da função $\arcsen x^{0.5}$. Os testes de normalidade e homocedasticidade foram efetuados antes das análises para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Nos casos em que houve diferença significativa entre os tratamentos, o teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias, ao nível de significância de 5% (ZAR, 1996).

RESULTADOS

As variáveis de qualidade da água temperatura da água, oxigênio dissolvido, pH e nitrogênio da amônia total (NAT) não foram afetados pelas concentrações de nitrito e nem pelos sistemas de cultivo - água clara e biofocos ($P \geq 0,05$) (Tabela 1). A salinidade não foi significativamente influenciada pelas concentrações de nitrito e pelos sistemas de cultivo ($P \geq 0,05$), apenas sua interação teve uma influência significativa ($P < 0,05$) sobre essa variável.

Tabela 1. Efeito das concentrações de nitrogênio do nitrito e dos sistemas de cultivo sobre as variáveis de qualidade da água durante o período experimental (média±desvio padrão).

Variáveis	Concentrações de N-NO ₂ (mg L ⁻¹) ⁽¹⁾				Sistema de cultivo ⁽²⁾		ANOVA (valores de P)		
	0	10	20	40	Água clara	Biofoco	AC	BFT	AC x BFT
Temperatura (°C)	26,62 (±1,29)	28,72 (±1,07)	28,73 (±1,24)	28,88 (±1,02)	28,65 (±1,17)	28,65 (±1,17)	NS	NS	NS
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	5,68 (±0,32)	5,63 (±0,28)	5,69 (±0,28)	5,57 (±0,33)	5,67 (±0,30)	5,61 (±0,31)	NS	NS	NS
pH	8,08 (±0,15)	8,10 (±0,12)	8,09 (±0,21)	8,08 (±0,14)	8,07 (±0,16)	8,10 (±0,16)	NS	NS	NS
Salinidade (g L ⁻¹)	25,89 (±0,85)	26,07 (±0,95)	25,88 (±0,85)	26,08 (±0,81)	26,31 ^b (±0,98)	25,65 ^a (±0,56)	NS	NS	*

NAT (mg L ⁻¹)	0,41 (±0,42)	0,43 (±0,37)	0,44 (±0,35)	0,53 (±0,44)	0,63 (±0,47)	0,21 (±0,17)	NS	NS	NS
N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	0,22 (±0,2)	10,0 (±1,5)	21,8 (±1,2)	39,8 (±4,5)	-	-	-	-	-

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. ⁽¹⁾ Média de seis repetições. ⁽²⁾ Média de doze repetições. AC - cultivo em água clara; BFT - cultivo com bioflocos; AC x BFT - interação das concentrações de NO₂-N com o sistema de cultivo; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. NS = não significativo (P≥0,05). * P<0,05.

Durante o período de cultivo, a temperatura média foi de 28,7 °C, variando de 25,4 a 33,2 °C. A salinidade mínima (24,0 g L⁻¹) e máxima (27,2 g L⁻¹) indicou uma pequena variação, registrando uma média de 26,0 g L⁻¹. O pH e o oxigênio dissolvido (OD) variaram de 7,47 a 8,60 e de 4,52 a 6,80 mg L⁻¹, respectivamente, com concentrações médias de 8,09 e 5,64 mg L⁻¹,

As concentrações do nitrogênio da amônia total, durante o período experimental mantiveram-se inferiores a 1,0 mg NAT L⁻¹, em todos os tratamentos (P≥0,05) (Tabela 1). Em nosso estudo, o inóculo de biofloco (50% do volume) para os tanques do tratamento BFT, sugerem que a comunidade de bactérias oxidantes da amônia (BOA) estava estabelecida, devido às baixas concentrações registradas para esse composto.

Os dados do desempenho zootécnico dos camarões, após 30 dias de cultivo, estão apresentados na Tabela 2. O peso inicial não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (P≥0,05). O peso médio final registrado ao final do experimento foi de 2,75±0,56 g, resultando em um ganho de peso médio de 1,15 g. As diferentes concentrações de nitrito, dos sistemas de cultivo e suas interações influenciaram significativamente os tratamentos (P<0,05), cujas menores médias de peso final foram 2,97, 2,87, 2,31 e 1,71 g, registradas para os tratamentos com água clara A-0, A-10, A-20 e A-40, respectivamente.

Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito e dos sistemas de cultivo sobre o desempenho do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado durante 30 dias (média±desvio padrão).

Variáveis	Concentrações de N-NO ₂ (mg L ⁻¹) ⁽¹⁾				Sistema de cultivo ⁽²⁾		ANOVA (valores de P)		
	0	10	20	40	Água clara	Biofloco	AC	BFT	AC x BFT
Peso inicial (g)	1,59 (±0,04)	1,59 (±0,10)	1,59 (±0,05)	1,62 (±0,06)	1,58 ^a (±0,07)	1,62 ^a (±0,05)	NS	NS	NS
Peso final (g)	3,17 ^a (±0,26)	2,97 ^b (±0,44)	2,56 ^{ab} (±0,37)	2,30 ^c (±0,70)	2,46 ^a (±0,57)	3,04 ^b (±0,38)	*	*	*
Sobrevivência	85,19 ^{ab}	90,74 ^a	85,19 ^{ab}	66,67 ^b	79,63 ^a	84,26 ^a	*	NS	NS

(%)	(±13,64)	(±12,99)	(±9,07)	(±32,96)	(±26,73)	(±12,04)			
TCE	2,29 ^c	2,04 ^{bc}	1,56 ^{ab}	1,04 ^a	1,39 ^a	2,08 ^b	*	*	*
(% dia ⁻¹)	(±0,22)	(±0,54)	(±0,43)	(±1,01)	(±0,88)	(±0,41)			

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. ⁽¹⁾ Média de seis repetições. ⁽²⁾ Média de doze repetições. AC - cultivo em água clara; BFT - cultivo com bioflocos; AC x BFT - interação das concentrações de N-NO₂ com o sistema de cultivo. TCE - Taxa de crescimento específico = $100 \times (\ln Pf - \ln Pi) / T$; Pi - peso inicial, Pf - peso final, T - tempo de cultivo. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. NS = não significativo (P≥0,05). * P<0,05.

As taxas de crescimento específico (TCE) diferiram significativamente entre os tratamentos e suas interações (P<0,05), registrando as menores médias 1,29, 0,15, 1,82 e 1,93 % dia⁻¹ para os tratamentos A-20, A-40, B-20 e B-40, respectivamente.

O efeito tóxico do nitrito aumentou com o tempo de exposição e o aumento das concentrações. Mortalidades foram observadas a partir do vigésimo dia de cultivo. A sobrevivência não foi significativamente influenciada pelos sistemas de cultivo e suas interações (P≥0,05), apenas as concentrações de nitrito tiveram influência significativa (P<0,05) sobre essa variável. Os menores valores de sobrevivência foram 85,2±12,8 e 40,7±23,1%, registrados nos tratamentos A-20 e A-40, respectivamente. Ao final do cultivo a sobrevivência média para os tratamentos água clara e biofoco foram de 79,6 e 84,2%, respectivamente.

A contagem total de hemócitos para concentrações de nitrito, sistemas de cultivo e suas interações estão apresentados na Tabela 3 (P≥0,05). A CTH variou de 1,4 a 3,7 x 10³ cel mm³ entre os tratamentos (P≥0,05). Não foram observadas interações significativas entre concentrações de nitrito e os sistemas de cultivo com relação a esta variável.

Tabela 3. Contagem total de hemócitos (CTH) dos camarões submetidos as diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito em dois sistemas de cultivo - água clara e biofoco (média±desvio padrão).

Concentrações de N-NO ₂ (mg L ⁻¹) ⁽¹⁾				Sistema de cultivo ⁽²⁾		ANOVA (valores de P)		
0	10	20	40	Água clara	Biofoco	AC	BFT	AC x BFT
3,2 x 10 ³ (±2,9)	2,9 x 10 ³ (±3,2)	3,2 x 10 ³ (±4,1)	2,6 x 10 ³ (±3,5)	2,5 x 10 ³ (±2,5)	3,4 x 10 ³ (±4,1)	NS	NS	NS

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. ⁽¹⁾ Média de seis repetições. ⁽²⁾ Média de doze repetições. AC - cultivo em água clara; BFT - cultivo com bioflocos; AC x BFT - interação das concentrações de N-NO₂ com o sistema de cultivo; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. NS = não significativo (P≥0,05). * P<0,05.

DISCUSSÃO

Durante o período experimental, a média da temperatura (28,7°C) e da salinidade (26 g L⁻¹) permaneceram dentro da faixa recomendada ao melhor desenvolvimento do *L. vannamei* (PONCE-PELAFOX, 1997). As concentrações médias de pH e oxigênio dissolvido foram 8,09 e 5,64 mg L⁻¹, consideradas ideais para a criação de camarões peneídeos (VAN WYK e SCARPA, 1999). Dessa forma, temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram favoráveis ao crescimento e a sobrevivência dos camarões.

Dos compostos nitrogenados inorgânicos os mais importantes no cultivo de organismos aquáticos são o nitrogênio da amônia total (NAT), do nitrito (N-NO₂) e nitrato (NO₃). O acúmulo desses compostos nos tanques de cultivo pode reduzir o crescimento, aumentar o consumo de oxigênio e a excreção dos animais, além de alterar as concentrações dos níveis de proteína e aminoácidos livres da hemolinfa dos camarões, causando elevada mortalidade (LIN e CHEN, 2001, 2003; KUHN et al. 2010). Durante o período experimental, as concentrações do nitrogênio da amônia total mantiveram-se inferiores a 1 mg NAT L⁻¹. Lin e Chen (2001) estimaram o nível de segurança de 0,16 mg NH₃-N L⁻¹ ou 3,55 mg NAT L⁻¹ em 25 g L⁻¹ de salinidade, para juvenis do camarão *L. vannamei*.

O nitrito é um produto intermediário da nitrificação da amônia e, tóxico para organismos aquáticos. Entretanto, o nitrato, produto final no processo de nitrificação é considerado relativamente menos tóxico (PIERCE et al., 1993; TOMASSO e GAMICH et al, 1986). No presente estudo, o peso final dos camarões foi significativamente influenciado pelas diferentes concentrações de nitrito, pelos sistemas de cultivo e suas interações (P<0,05). Khun et al. (2010) registraram diferenças significativas no crescimento dos camarões *L. vannamei* submetidos a toxicidade crônica do nitrato em diferentes salinidades. Os autores relataram que o crescimento foi negativamente correlacionado com a salinidade em níveis elevados de nitrato. Por outro lado, Furtado et al. (2015) trabalhando com a mesma espécie não encontraram diferenças significativas no crescimento do camarão quando cultivado em sistema de bioflocos e diferentes concentrações de nitrato (75, 150, 300 e 600 mg NO₃ L⁻¹).

Foram observadas diferenças significativas na taxa de crescimento específico (TCE) entre os tratamentos e suas interações (P<0,05). Esses resultados são similares aos encontrados por Campos et al. (2013) quando registraram TCE de 1,18 a 1,27 % dia⁻¹ avaliando os efeitos crônicos da amônia, nitrito e nitrato no consumo alimentar do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*. Do mesmo modo, Campos et al. (2014) trabalhando com a mesma espécie registraram taxas de crescimento de 2,22 , 2,46 e 2,12 % dia⁻¹ para concentrações de 5,36, 10,64 e 21,21 mg N-NO₂ L⁻¹, durante 30 dias cultivo.

Em nosso estudo, a sobrevivência foi significativamente influenciada pelas concentrações de nitrito ($P < 0,05$). Ao final de 30 dias de cultivo, foi registrada uma sobrevivência média de 79,6 e 84,2% para os sistemas água clara e bioflocos, respectivamente.

Gross et al. (2004) ao estudar a toxicidade do nitrito para o camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado por 21 dias em água com baixa salinidade (2 g L^{-1}), registraram sobrevivência média de 50% para as concentrações de 0, 1, 2 e 4 mg N-NO₂ L⁻¹ e 20% para a concentração de 8 mg N-NO₂ L⁻¹. Campos et al. (2013) registraram taxas de sobrevivência superiores a 90% ao cultivar o camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* (70 juvenis m⁻²) por 28 dias de exposição crônica às concentrações de 5,63, 10,64 e 21,21 mg L⁻¹ de N-NO₂. Segundo Buikema et al. (1982), testes de toxicidade aguda podem fornecer informações sobre a letalidade de substâncias tóxicas, mas não podem prever a concentração que tem efeitos subletais e crônicos sobre os organismos. Lin e Chen (2003) estimaram o nível de segurança de 15,2 e 25,7 mg N-NO₂ L⁻¹ para as salinidades de 25 e 35 g L⁻¹ para juvenis de *L. vannamei*, respectivamente. Por sua vez, Correia et al. (2014) avaliaram o efeito de duas rações comerciais (30 e 40% proteína bruta) em sistema de bioflocos e registraram índices acima de 82% na sobrevivência de pós-larvas de *L. vannamei* criadas em raceways (5000 PL m⁻³) por 62 dias, onde registraram concentrações máximas de 34 e 29 mg N-NO₂ L⁻¹.

Cheng e Chen (2001) relatam que a contagem total de hemócitos (CTH) é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o estado de saúde dos camarões, e pode variar em resposta ao estresse ambiental, atividade endócrina, ciclo de muda e infecções virais ou bacterianas (JOHANSSON et al., 2000; JIRAVANICHPAISAL et al., 2006). No presente estudo não foram observadas interações significativas entre as concentrações de nitrito e os sistemas de cultivo com relação à contagem total de hemócitos ($P \geq 0,05$). Segundo Barretto et al. (2012) contagens de hemócitos abaixo de $5 \times 10^6 \text{ cel mm}^{-3}$ são consideradas baixas ou muito baixas, superiores às registradas no presente estudo.

Tseng e Chen (2004) examinaram os efeitos ao estresse do nitrito, no camarão *Litopenaeus vannamei*, na resposta imune ao *Vibrio alginolyticus*. Eles detectaram que o camarão exposto às concentrações de nitrito entre 5 e 22 mg N-NO₂ L⁻¹, apresentaram resistência significativamente reduzida à infecção bacteriana. Este estudo foi realizado por meio de análises da contagem de hemócitos (células vermelhas do sangue dos invertebrados). Chen e Chen (1992) observaram que as concentrações de nitrito na hemolinfa do camarão *Penaeus japonicus* foram maiores que as concentrações testes (2, 4, 8 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹) após 16 horas de exposição.

CONCLUSÃO

A sobrevivência não foi comprometida para os tratamentos com a tecnologia de bioflocos. As concentrações de nitrito de 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹ para os dois sistemas de cultivo, água clara e bioflocos, afetaram o crescimento do camarão *Litopenaeus vannamei*. Complementarmente, nas condições experimentais adotadas, a quantidade total de hemócitos não foi influenciada pelas concentrações de nitrogênio do nitrito ou pelos sistemas de cultivo, mas, registraram concentrações inferiores às consideradas adequadas pela literatura.

AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) no âmbito do Programa Nacional de Carcinicultura (RECARCINA) pelo suporte financeiro. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS

- ASADUZZAMAN, M., WAHAB, M.A., VERDEGEM, M.C.J., HUQUE, S., SALAM, M.A., AZIM, M.E. 2008 C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production ponds. *Aquaculture*, 280(1-4):117-123.
- AZIM, M.E., LITTLE, D.C. 2008 The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283(1-4):29-35.
- BARRETTO, A.C.G.; GÓES, L.M. N.; NASCIMENTO, D.L.; MENDES, P.P.; RÊGO, E.W.; MENDES, E.S. 2012 Influência da refrigeração na preservação do número total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados utilizando-se citrato de sódio. *Ciência Animal Brasileira*, 13(4):520-524.
- BUIKEMA, A.L.; NIEDERLEHNER, R.R.; CAIRNS. J.J. 1982 Biological monitoring Part IV. Toxicity testing. *Water Reserch*, 16:239-262.
- BROWNELL, C.L. 1980 Water quality requirements for first feeding in marine fish larvae: ammonia, nitrite and nitrate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 44(2):269-283.

- CAMPOS, B.R.; FURTADO, P.S.; D'INCAO, F.; WASIELESKY, W.; POERSCH, L.H.S. 2013 Compostos nitrogenados sobre o consumo alimentar de camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Ciência Rural*, 43(12):2202-2207.
- CAMPOS, B.R.; FURTADO, P.S.; D'INCAO, F.; POERSCH, L.H.; WASIELESKY JR., W. 2014 The effect of ammonia, nitrite, and nitrate on the oxygen consumption of juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea:Decapoda). *Journal of Applied Aquaculture*, 26(1):94-101.
- CHAMBERLAIN, G.; AVNIMELECH, Y.; McINTOSH, R. P.; VELASCO, M. 2001 Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N - I: Nutrient transformation and water quality benefits. *The Global Aquaculture Advocate*, 53-56.
- CHEN, J.C., CHEN, S.F. 1992 Accumulation of nitrite in hemolymph of *Penaeus japonicus*. *Marine Ecology Progress Series*. 83(4):305-308.
- CHEN, J.C.; CHENG, S.Y. 1995 Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Aquatic Toxicology*, 33(3-4):215-26.
- CHEN, J.C., CHIN, C.K., LEE, C.K. 1986 Effects of ammonia and nitrite on larval development of the shrimp *Penaeus monodon*. The First Asian Fisheries Forum. *Asian Fisheries Society*, 657-662.
- CHENG, S.Y., CHEN, J.C. 1999 Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology*, 45(1):35-46.
- CHENG, W., CHEN, J.C., 2001 Effects of intrinsic and extrinsic factors on the hemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* 11(1):53-63.
- CORREIA, E.S.; WILKENFELD, J. S.; MORRIS, T.C.; WEI, L.; PRAGNELL, D.I.; SAMOCHA, T.M. 2014 Intensive nursery production of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in biofloc-dominated system. *Aquacultural Engineering*, 59(3-março):48-54.
- COLT, J.E.; ARMSTRONG, D.A. 1981 Nitrogen toxicity to fish, crustaceans and molluscs. In: ALLEN, LJ, EC KINNEY. (eds.) *Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture Section*, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p.34-47.
- CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRATE, W.; 2007 Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1-4):1-14.
- CRAB, R.; KOCHVA, M.; VERSTRATE, W.; AVNIMELECH, Y. 2009 Bioflocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering*. 40(3):105-112.

- EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., BISOGNI, J.J. 2006 Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4): 346-358.
- FURTADO, P.S.; CAMPOS, B.R.; SERRA, F.P.; KLOSTERHOFF, M.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY JR., W. 2015 Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*, 23(1):315-327.
- FRÍAS-ESPERICUETA, M.G.; PAÉZ-OSUNA, F. 2001 Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones, In PAÉZ-OSUNA, F. (ed.). *Camaronicultura y Medio Ambiente*. El Colegio de Sonora, Mazatlán, Sinaloa, México. p. 253-276.
- GROSS, A.; ABUTBUL, S.; ZILBERC, D. 2004 Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *The Journal of the World Aquaculture Society*, 35(3):315-321.
- HAGOPIAN, D.S.; RILEY, J.G. 1998 A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18(4):223-244.
- HARGREAVES, J.A. 2006 Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34(3):344-363.
- HENNIG, O., ITAMI, T., MAEDA, M., KONDO, M., NATUSKARI, Y., TAKAHASHI, Y. 1998 Analyses of haemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid Rod-shaped DNA virus. *Fish Pathology*. 33(4):389-393.
- KROUPOVA, H., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z. 2005 Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina – Czech*, 50(11):461-471.
- KUHN, D.; SMITH, S.A.; BOARDMAN, G.D.; ANGIER, M.W.; MARSH, L.; FLICK JR, G.J. 2010 Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture*. 309(1-4):109-114.
- JENSEN, F. 2003 Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 135(1): 9-24.
- JIRAVANICHPAISAL, P., LEE, B.L., SÖDERHÄLL, K. 2006 Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4): 213-36.
- JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUKS, ANA, K., SÖDERHÄLL, K. 2000 Crustacean hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3): 45-52.
- JORY, D.E.; CABRERAS, R.T.; DURWOOD, M.D.; FEGAN, D.; LEE, G.P.; LAWRENCE, A.L.; JACKSON, J.C.; MCINTOSH, P.R.; CASTANEDA, A.J. 2001 A global review of shrimp feed management: status and perspectives. *Aquaculture*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge

- LIN, Y.C.; CHEN, J.C. 2001 Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259(1): 109-119.
- LIN, Y.C.; CHEN, J.C. 2003 Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224(1-4):193-201.
- MAGGIONI, D.S., ANDREATTA, E.R., HERMES, E.M., BARRACCO, M.A. 2004 Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture*, 241(1-4):501-515.
- PIERCE, R.H.; WEEKS, J.M.; PRAPPAS, J.M. 1993 Nitrate toxicity to five species of marine fish. *The Journal of the World Aquaculture Society*, 24(1):105-107.
- PONCE-PALAFOX, J.P. 1997 The Effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1-2): 107-115.
- TAHON, J.P.; HOOF, D VAN.; VINCKIER, C.; WITTERS, R.; LEY, M.; LONHE, R. 1988 The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *The Biochemical Journal*, 249(3):233-242.
- TOMASSO, J.R.; GAMICHAEL, G.J. 1986 Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the Guadalupe bass, *Micropterus treculi*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(1):866-870.
- TSENG, I.T., CHEN, J.C. 2004 The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 17i(4):325-333.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; JETTEN, M.S.M. 1998 Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 38(1):1-7.
- VAN WYK, P.; SCARPA, J. 1999 Water quality requirements and management. In: VAN WYK P et al (eds) *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*. Florida department of agriculture and consumer services, Tallahassee, p 141-162.
- ZAR, J.H., 1996 Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey. p622.

Anexo I – Normas da Revista

O BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA (BIP), ISSN 0046-9939 (impresso) e ISSN 1678-2305 (online), site: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>, está classificado atualmente no WEBQUALIS como B1 nas áreas de Engenharias I e Geografia e como B2 em: Zootecnia/Recursos Pesqueiros; Biodiversidade; Ciências Agrárias I; Ciências Ambientais; Interdisciplinar e Medicina Veterinária. Seu índice de impacto no JCR é 0,474.

Os arquivos eletrônicos contendo o original e demais documentos necessários devem ser encaminhados ao Comitê Editorial do Instituto de Pesca, pelo e-mail: ceipboletim@gmail.com. O BIP é destinado à publicação de documentos originais (artigos científicos e notas científicas), que contribuam para a ampliação do conhecimento nas áreas de pesca (tecnologia de pesca, biologia pesqueira, sociologia e economia pesqueiras), aquicultura, limnologia, ecologia aquática, tecnologia e sanidade do pescado e patologia de organismos aquáticos.

É publicado um volume por ano, com o pertinente número de fascículos.

O processo de avaliação utilizado pelo Comitê Editorial do Instituto de Pesca é o sistema por pares “blind review”, ou seja, sigilo sobre a identidade, tanto dos autores quanto dos revisores, que será mantido durante todo o processo.

O periódico também aceita e incentiva submissões de artigos redigidos em inglês ou espanhol. Em caso de autores não nativos de países que falem estas línguas, o artigo deverá ser revisado por um especialista que o próprio Comitê Editorial do Instituto de Pesca poderá indicar.

Todo trabalho submetido ao Boletim será avaliado preliminarmente pelo Comitê Editorial e, se superar essa primeira triagem, será enviado para dois revisores especialistas na área abordada. A publicação se dará somente com a aprovação do documento pelos revisores, cabendo ao Comitê Editorial do Instituto de Pesca a decisão final do aceite.

A seleção dos artigos será baseada na originalidade, qualidade e mérito científico. O Comitê Editorial tomará o cuidado para que os revisores de cada artigo sejam, obrigatoriamente, de instituições distintas daquelas de origem dos autores.

As opiniões emitidas nos trabalhos são de exclusiva responsabilidade de seus autores. O Boletim do Instituto de Pesca reserva-se o direito de realizar pequenas adaptações nos originais visando manter a uniformidade da publicação.

Tipos de documentos publicáveis no BIP

Artigo Científico

Trabalho resultante de pesquisa científica, apresentando dados originais obtidos de forma planejada, com base em métodos cientificamente aceitos, rigorosamente controlados e com planejamento

estatístico adequado, que possam ser replicados e generalizados. A discussão deve ser criteriosa, com base científica sólida; não deve se limitar a comparações dos resultados com a literatura, mas apresentar inferências, hipóteses e argumentação sobre o que foi estudado.

Nota Científica

Comunicação curta de fato inédito resultante de pesquisa científica, cuja divulgação imediata se justifica, mas com informações insuficientes para constituir um artigo científico. Incluem-se nesta categoria a descrição de uma técnica, o registro da descoberta de uma nova espécie, observações e levantamentos de resultados de experimentos que não podem ser repetidos, e outras situações únicas. Deve ter o mesmo rigor de um Artigo Científico e conter os elementos necessários para avaliação dos argumentos apresentados.

PROCEDIMENTOS EDITORIAIS

Custo de publicação

O custo é de R\$40,00 (quarenta reais) por página final editorada para publicação. No ato da submissão é requerido um depósito de R\$100,00 (cem reais) não reembolsáveis, mas deduzido do custo final dos artigos aprovados.

Os depósitos ou transferências deverão ser efetuados em nome da FUNDAG, no Banco do Brasil: agência 3360-X– conta corrente 4200-5, código de identificação do depósito: 1161. O comprovante de depósito ou transferência deve ser enviado para o e-mail do Comitê Editorial (ceipboletim@gmail.com), junto com o original submetido. Para a emissão de recibo da FUNDAG, enviar os seguintes dados: Nome, CPF, telefone e endereço completo (incluir o bairro).

Submissão de trabalho

O trabalho deverá ser enviado via e-mail, devidamente identificado, em arquivo do WORD.

Em trabalhos que envolvam a manipulação de vertebrados deve ser encaminhado um atestado de que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição de origem da pesquisa.

Após a aprovação do trabalho, deverá ser encaminhado ao Comitê Editorial o documento Cessão de Direitos Autorais e Autorização para Publicação em Meio Eletrônico, contendo apenas a assinatura do autor responsável pela submissão do trabalho, e cujo modelo está em: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>.

Avaliação do trabalho

1.O trabalho submetido será em primeira instância avaliado pelo Comitê Editorial.

2.Após aprovação preliminar pelo Comitê Editorial, e segundo a ordem cronológica de recebimento, o trabalho será enviado a no mínimo dois revisores de reconhecida competência no assunto abordado. Em seguida, se necessário, retornará ao(s) autor(es) para modificações/correções. O retorno do texto poderá ocorrer mais de uma vez, se assim o(s) revisor(es) solicitar(em).

3.O trabalho será aceito para publicação se tiver dois pareceres favoráveis, ou rejeitado quando pelo menos dois pareceres forem desfavoráveis. No caso de pareceres contraditórios entre os revisores, o trabalho será enviado a um terceiro revisor.

4.O trabalho aceito retornará ao(s) autor(es) para ultimar eventuais alterações propostas e realizar rigorosa revisão, antes que o documento seja submetido ao processo de editoração e formatação ao estilo do Boletim. O prazo para devolução dessa versão final revisada será de sete dias **ATENÇÃO**: se o trabalho for rejeitado na avaliação prévia do Comitê Editorial (por inadequação às normas do BIP, por não se enquadrar no escopo temático da revista, por problemas redacionais [impropriedades linguísticas, morfológicas ou sintáticas] ou por falta de qualidade técnica) ou na avaliação final dos revisores “ad hoc”, o depósito não será devolvido, nem poderá ser reutilizado para outras submissões dos autores.

Disposições finais

Casos omissos serão avaliados pelo comitê Editorial do Instituto de Pesca.

FORMATAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

Instruções gerais

O trabalho deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, de acordo com a seguinte formatação: fonte Book Antiqua, tamanho 11; espaçamento entre linhas: 1,5; tamanho da página: A4; margens

esquerda e direita: 2,5 cm; margens superior e inferior: 3,0 cm; número máximo de páginas, incluindo Figura(s) e/ou Tabela(s) e Referências: Artigo Científico: até 25 páginas; Nota Científica: até 15 páginas. As linhas devem ser numeradas sequencialmente, da primeira à última página. As páginas também devem ser numeradas.

Estrutura de Artigo Científico

A estrutura para o Artigo Científico é a seguinte: Título, Autor(es), Endereços institucionais (completos) e eletrônicos, Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (opcional), Referências.

O Título, o Resumo e as Palavras-chave devem ser traduzidos para o inglês, no caso de artigos redigidos em português ou espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês ou espanhol.

Os termos: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências devem ser alinhados à esquerda e grafados em letras maiúsculas e em negrito.

TÍTULO

Deve ser claro e conciso (não deve se estender por mais do que duas linhas ou dez palavras), redigido em português e inglês ou, se for o caso, em espanhol, inglês e português. Deve ser grafado em letras maiúsculas e centralizado na página. No caso de trabalho desenvolvido com auxílio financeiro, informar na primeira página qual o agente financiador, indicado com asterisco, também apostado ao final do título.

Recomenda-se que não seja inserido o nome científico da espécie e a referência ao seu descritor, a não ser que seja imprescindível (no caso de espécies pouco conhecidas).

NOME DO(S) AUTOR(ES)

Deve(m) ser apresentado(s) completo(s) e na ordem direta (prenome e sobrenome), com apenas o sobrenome pelo qual o(s) autor(es) deve(m) ser identificado(s) em caixa alta. A filiação do(s) autor(es), bem como um endereço completo para correspondência e um e-mail deverão ser colocados na primeira página, logo após o nome dos autores, sendo identificado(s) por números arábicos, separados por vírgula quando necessário.

Obs: Não serão aceitos trabalhos com mais de seis autores

RESUMO e Palavras-chave

O Resumo deve conter concisamente os objetivos, a metodologia, os resultados obtidos e as conclusões, utilizando no máximo 150 (cento e cinquenta) palavras. Deve ser redigido de forma que o leitor se interesse pela leitura do trabalho na íntegra.

Palavras-chave: no mínimo três (3) e no máximo seis (6), redigidas em letras minúsculas e separadas por ponto e vírgula. Não devem repetir palavras que constem do Título e devem identificar o assunto tratado, permitindo que o artigo seja encontrado no sistema eletrônico de busca.

ABSTRACT e Key words

Devem ser estritamente fiéis ao Resumo e Palavras-chave.

INTRODUÇÃO

Deve ocupar, preferencialmente, no máximo duas páginas, apresentando o problema científico a ser solucionado e sua importância (justificativa para a realização do trabalho), bem como a evolução/situação atual do assunto pesquisado. O último parágrafo deve expressar o objetivo, sendo coerente com o que consta no Resumo.

MATERIAL E MÉTODOS

Deve descrever sucintamente toda a metodologia utilizada, organizada de preferência na ordem de aplicação e de modo que o experimento possa ser reproduzido. Este item pode variar de acordo com a natureza temática do documento, mas em geral deve conter a descrição do procedimento amostral local, frequência, período, instrumento e métodos, outras variáveis relevantes ou o delineamento do experimento, a descrição dos tratamentos e das variáveis, o número de repetições e as características da unidade experimental. Deve informar sobre procedimentos estatísticos e transformações de dados.

Deve-se evitar detalhes supérfluos, extensas descrições de técnicas de uso corrente e a utilização de abreviaturas não usuais.

RESULTADOS

Os Resultados devem ser apresentados em separado da Discussão. E isto pode ser feito textualmente ou sob a forma de Tabelas e/ou Figuras. Dados apresentados em Tabelas ou Figuras não devem ser repetidos sistematicamente no texto.

Tabelas:

Devem ser numeradas com algarismos arábicos e encabeçadas pelo Título (autoexplicativo). Recomenda-se que os dados apresentados em tabelas não sejam repetidos em gráficos, a não ser quando absolutamente necessário. As tabelas devem ter, no máximo, 16 cm de largura. Deve-se evitar, sempre que possível, tabelas em formato “paisagem”. Abreviaturas também devem ser evitadas, a não ser para unidades de medida. Se necessárias, porém, devem ter seu significado indicado em legenda sob a tabela.

Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotos):

Devem ter, no máximo, 16 cm de largura e 21 cm de altura, ser numeradas com algarismos arábicos, com título autoexplicativo logo abaixo. Palavras em gráficos e mapas devem estar em fonte legível. Recomenda-se não inserir gráficos, mapas ou fotos em tabelas ou quadros. Os gráficos não devem ter linhas de grade nem margens.

Tabelas e Figuras devem ser inseridas no item mais apropriado no transcorrer do texto. Os originais de desenhos, mapas e fotos devem ser enviados em arquivos distintos, preferencialmente em formato digital “tif” ou “jpeg, e permitir redução para 16 cm ou 7,5 cm de largura sem perda de definição.

DISCUSSÃO

A Discussão deve ser elaborada e não apenas uma comparação dos dados obtidos com os disponíveis em literatura. Deve focar e demonstrar as principais ideias e contribuições trazidas pelo trabalho, bem como comentar se há necessidade de novas pesquisas ou sobre eventuais limitações encontradas. Evitar repetir números já constantes dos resultados. A Discussão deve conter hipóteses e/ou comentários objetivos sobre os resultados, discutidos à luz de observações constantes da literatura especializada.

CONCLUSÃO

A Conclusão deve ser clara, concisa e responder ao objetivo do estudo. Deve, idealmente, ser capaz de propor uma solução (ou caminho de solução) para a demanda/problema, com base nos resultados obtidos.

AGRADECIMENTOS (opcional)

Devem ser sucintos, dirigidos a Instituição ou pessoa que tenha efetivamente colaborado para a realização do trabalho. De preferência, não deve ultrapassar cinco linhas.

Estrutura de Nota Científica

A Nota Científica deve seguir ordenação similar à de um Artigo Científico, contendo Título, Autor, Endereços institucional e eletrônico, Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultado(s) e, eventualmente, Discussão, Agradecimento(s) (opcional) e Referências. Resultados e Discussão, neste caso, podem ser apresentados como item único.

A formatação segue o mesmo padrão, mas com no máximo 15 páginas (incluindo Tabelas e Figuras).

Obs: Não serão aceitos trabalhos com mais de seis autores

REFERÊNCIAS (normas para TODOS os tipos de publicação)

Devem ser apresentadas em ordem alfabética do sobrenome dos autores, sem numeração. Devem conter os nomes de todos os autores, ano de publicação, o título do artigo (por extenso) e do periódico (também por extenso), número do volume e/ou edição e número e/ou intervalo de páginas.

A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido citados no texto são de responsabilidade do autor.

Dissertações e teses devem ser evitadas como referências. Porém, aceita-se quando absolutamente necessárias, mas devem estar disponíveis on-line.

Trabalhos de conclusão de graduação e resumos apresentados em congressos não são referências válidas.

Observação: inadequações nas referências também acarretarão a recusa do trabalho e a não devolução da taxa de submissão.

Como fazer citações no texto

Usar o sistema autor/data, ou seja, o sobrenome do autor em letras maiúsculas e o ano em que a obra foi publicada. Exemplos:

* para um autor: “MIGHELL (1975) observou...”; “Segundo AZEVEDO (1965), a piracema...”; “Estas afirmações foram confirmadas em trabalhos posteriores (WAKAMATSU, 1973)”.

* para dois autores: “RICHTER e EFANOV (1976) pesquisando...” Se o artigo que está sendo submetido estiver redigido em português, utilizar “e” ligando os sobrenomes dos autores. Se estiver redigido em inglês utilizar “and” (RICHTER and EFANOV, 1976), se em espanhol, utilizar “y” (RICHTER y EFANOV, 1976).

* para três ou mais autores: o sobrenome do primeiro autor deve ser seguido da expressão “et al.” (grafada em itálico). Exemplo: “SOARES et al. (1978) constataram...” ou “Tal fato foi constatado na África (SOARES et al., 1978).”

* para o mesmo autor, em documentos de anos diferentes, respeitar a ordem cronológica, separando os anos por vírgula. Exemplo: “De acordo com SILVA (1980, 1985)...”

* para citação de vários autores sequencialmente, respeitar a ordem cronológica do ano de publicação e separá-los por ponto e vírgula. Exemplo: “...nos viveiros comerciais (SILVA, 1980; FERREIRA, 1999; GIAMAS e BARBIERI, 2002)...”

* quando for ABSOLUTAMENTE necessário se referir a um autor, ainda que não em razão de uma consulta direta ao trabalho por ele publicado, o nome desse autor deve ser citado em letras minúsculas apenas no texto, indicando-se logo a seguir, entre vírgulas e precedido da palavra latina apud, o nome do autor e ano do trabalho efetivamente consultado no qual aparece a referência ao autor não diretamente lido.

Ex.: “Segundo Gulland,apud SANTOS (1978), os coeficientes...”.

Como fazer citações na listagem de REFERÊNCIAS

1.DE DOCUMENTOS IMPRESSOS

Artigos científicos são listados como segue:

*Para dois autores, relacionar o documento referido no texto pelo sobrenome dos autores em letras maiúsculas, cada qual seguido das iniciais dos prenomes (separadas por ponto e sem espaço),conectados por “e”, “and” ou “y”, se o texto submetido for redigido em português, inglês ou espanhol, respectivamente. Exemplo:

IRSHADULLAH, M. e MUSTAFA, Y. 2012 Pathology induced by Pomporhynchus kashmiriensis (Acanthocephala) in the alimentary canal of naturally infected Chirruh snowtrout, Schizothorax esocinus(Heckel).Helminthology, 49: 11-15.

*Para mais de dois autores, os nomes devem ser ordenados como citado acima, mas separados por ponto e vírgula.Exemplo:

SQUADRONE, S.; PREARO, M.; BRIZIO, P.; GAVINELLI, S.; PELLEGRINO, M.; SCANZIO, T.; GUARISE, S.; BENEDETTO, A.; ABETE, M.C. 2013 Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (Silurus glanis) from Italian rivers. Chemosphere, 90: 358-365.

As referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor principal. Havendo mais de uma obra com o mesmo sobrenome, considera-se a ordem cronológica e, persistindo a coincidência, a ordem alfabética do terceiro elemento da referência.

Recordando, após o nome dos autores, inserir o ano da publicação, o título do artigo, o título do periódico (em itálico; e que, repetindo, NÃO DEVE SER ABREVIADO), o volume (também em itálico), o fascículo e o número/intervalo de páginas.

#A citação de dissertação e tese, tipos de documentos que se pode utilizar apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário e se estiver disponível on line, deve ser feita como segue:

BERNADOCHI, L.C. 2012 Captação de sementes em coletores artificiais e cultivo da ostra

perlífera *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteriidae), São Paulo, Brasil. São Paulo. 75f. (Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesca, APTA). Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/dissertacoes.pg.php>> Acesso em: 22 ago. 2014.

Para livro, também utilizado apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário, a citação deve ser:

GOMES, F.P. 1978 Curso de estatística experimental. 8ª ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 430p.

ENGLE, R.F. e GRANGER, C.W.J. 1991 Long-run economic relationship: readings in cointegration. New York: Oxford University Press. 301p.

NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D’ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. Freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, Oxford. 544p.

Capítulo de livro ou publicação em obra coletiva, cita-se:

MORAES-VALENTI, P. e VALENTI, W.C. 2010 Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D’ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. Freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, Oxford. p. 485-501.

Leis, Decretos, Instruções Normativas e Portarias são incluídas na listagem como segue: BRASIL, 1988 CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de outubro de 1988, nº. 191-A, Seção 1, p. 1.

BRASIL, 2000 LEI nº. 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o Art. 225, § 1º, incisos I, II, III, e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 19 de julho de 2000, nº. 138, Seção 1: p. 45.

BRASIL, 1990 DECRETO nº. 98.897, de 30 de janeiro de 1990. Dispõe sobre as reservas extrativistas e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 31 de janeiro de 1990, nº. 22, Seção 1, p. 2.

BRASIL, 2007 INSTRUÇÃO NORMATIVA nº. 02, de 18 de setembro de 2007. Disciplina as diretrizes, normas e procedimentos para formação e funcionamento do Conselho Deliberativo de Reserva Extrativista e de Reserva de Desenvolvimento Sustentável. Diário Oficial da União, 20 de setembro de 2007, nº. 182, Seção 1, p. 102.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2010b PORTARIA nº. 77, de 27 de agosto de 2010. Cria o Conselho Deliberativo da Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo/RJ. Diário Oficial da União, Brasília, 01 de setembro de 2010, nº. 168, Seção 1: p. 69.

2. DE MEIOS ELETRÔNICOS (periódicos publicados exclusivamente on line; documentos consultados on line e em CD-ROM)

Exemplos:

LAM, M.E. e PAULY, D. 2010 Who is right to fish? Evolving a social contract for ethical fisheries. Ecology and Society, 15(3): 16. [online] URL: <<http://www.ecologyandsociety.org/vol15/iss3/art16/>>

CASTRO, P.M.G. (sem data, on line) A pesca de recursos demersais e suas transformações temporais. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/textos.php>> Acesso em: 3 set. 2014.

TOLEDO PIZA, A.R.; LOBÃO, V.L.; FAHL, W.O. 2003 Crescimento de *Achatina fulica* (gigante africano) (Mollusca: Gastropoda) em função da densidade de estocagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 55., Recife, 14-18 jul./2003. Anais... Recife: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 1 CD-ROM.

INSTRUÇÕES COMPLEMENTARES

1. Fórmula, expressão e equação matemática

Se não apresentar caracteres especiais, pode ser inserida no texto. Exemplo: Ganho de peso = peso final – peso inicial. Caso possua caracteres especiais, deve ser grafada em linha isolada.

2. Unidade de medida

Deve ser apresentada segundo o Sistema Internacional de Unidades (SI). Exemplo: 10 m²; 100 peixes m⁻¹; 20 t ha⁻¹.

3. Número de casas decimais

Deve ser padronizado para todo o texto. Por exemplo, grafado o comprimento dos exemplares amostrados com uma casa decimal, em todo o texto os valores referentes a esse parâmetro devem ser grafados com uma casa decimal.

4. Anexo e apêndice

Devem ser incluídos apenas quando imprescindíveis à compreensão do trabalho.

Caberá aos Revisores e Editores julgar a oportunidade de sua publicação.

5.2 Artigo Científico II

EFEITO DA TOXICIDADE DO NITRITO SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Fabiana Penalva de Melo; Maria Gabriela Padilha Ferreira; Ítalo Felipe Mascena Braga;

Eudes de Souza Correia

Manuscrito a ser submetido à
Revista Ciência Rural, ISSN Eletrônico 1678-4596

**Efeito da toxicidade do nitrito sobre o consumo alimentar do
camarão *Litopenaeus vannamei***

Nitrite toxicity effect on feed consumption of *Litopenaeus vannamei* shrimp

Fabiana Penalva de Melo^{1*} Maria Gabriela Padilha Ferreira² Ítalo Felipe Mascena

Braga² Eudes de Souza Correia²

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do nitrito (N-NO₂) sobre a sobrevivência, o crescimento e o consumo alimentar de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema de água clara. Foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado com seis concentrações nominais de N-nitrito (0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹), com três repetições. Foram utilizados 18 tanques de polietileno (30 L de volume útil) estocados em densidades de 75 camarões m⁻² (2,51±0,02 g). Oxigênio dissolvido e pH não apresentaram diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos. A temperatura da água, salinidade, N-amônia e alcalinidade total foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Após 30 dias de cultivo, o peso final (2,50-5,01 g), ganho de peso (0,01-2,51 g), taxa de crescimento específico (0,03-2,32 % dia⁻¹), sobrevivência (0,00-100 %), comprimento das antenas e o consumo alimentar dos camarões foram significativamente influenciados ($P < 0,05$) pelas concentrações mais elevadas de N-nitrito. Desta forma, é possível cultivar o camarão *L. vannamei* em concentrações de 10 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹ por um período de 30 dias sem comprometer a sobrevivência e o consumo alimentar.

Palavras-chave: nitrito, consumo alimentar, água clara, cultivo.

¹ Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola (LAPAq), Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: fabianapenalva@gmail.com, mariagabriela.ferreira@gmail.com, ecorreia@depaq.ufrpe.br

ABSTRACT

The aimed to evaluate the toxicity of N-nitrite on growth, survival and feed consumption of *Litopenaeus vannamei* juveniles reared in clear water system. A completely randomized design with six nominal concentrations of N-nitrite (0, 10, 20 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹) with three replicates for each treatments was used. They used 18 polyethylene tanks (30 L working volume) stocked with densities of 75 shrimp m⁻² (2.51 ± 0.02 g). Dissolved oxygen and pH showed no statistical difference ($P \geq 0.05$) between treatments. Water temperature, salinity, total alkalinity and TAN were significantly different ($P < 0.05$) among the treatments. After 30 days of culture, final weight (2.50-5.01 g), gain weight (0.01-2.51 g), specific growth rate (0.03-2.32 % day⁻¹), survival (0.00-100 %), length of antennas and feed consumption of shrimps were significantly influenced ($P < 0.05$) by the higher concentrations of N-nitrite. Thus, it is possible to culture *L. vannamei* shrimp at concentrations of 10 and 20 mg N-NO₂ L⁻¹ for a period of 30 days without compromising survival and feed consumption.

Key words: nitrite, food consumption, water clear, culture.

INTRODUÇÃO

Amônia, nitrito e nitrato são componentes essenciais à sustentabilidade da vida de vários microrganismos aquáticos e, nos ecossistemas aquáticos, são as formas mais comuns de nitrogênio inorgânico dissolvido (ROMANO e ZENG, 2013). Entretanto, níveis excessivos podem afetar significativamente a abundância e as condições fisiológicas de vários animais aquáticos, incluindo os crustáceos. Além disso, estes compostos são uma preocupação global e fator limitante importante na indústria da carcinicultura, particularmente desde que há tendência de se utilizar sistemas de cultivo mais intensivos, com uma maior dependência de insumos para alimentação animal (BOUWMAN et al., 2011; FAO, 2011).

Em sistemas de cultivo aquícola, a amônia é o composto tóxico mais comum resultante da excreção dos animais cultivados e mineralização de detritos orgânicos, alimento não consumido e fezes. O nitrito é um importante produto intermediário no processo de nitrificação ou desnitrificação do nitrato no ciclo do nitrogênio (JENSEN, 2003, KROUPOVA et al., 2005). Dentre os compostos nitrogenados tóxicos em sistemas de cultivo intensivo ou superintensivo, o nitrito merece uma atenção especial, pois pode ocorrer seu acúmulo devido ao desequilíbrio nas taxas de nitrificação ou ao baixo aproveitamento deste composto pelas bactérias (PHILIPS et al., 2002; EBELING et al., 2006), podendo atingir concentrações da ordem de $34 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ (CORREIA et al., 2014).

O nitrito tem influência sobre diversas funções biológicas. Quando presente na água, nitrito é imediatamente incorporado na hemolinfa e intestino médio de camarões através da absorção branquial, acumulando-se nos tecidos (CHENG e CHEN, 1999). A exposição ao nitrito diminuiu significativamente a tolerância à temperatura em pós-larvas do camarão *Penaeus setiferus* (camarão branco) (ALCARAZ et al., 1997) e induziu alterações comportamentais e morfológicas em anfíbios (MARCO e BLAUSTEIN, 1999), como redução na atividade alimentícia, desequilíbrio, paralisia e eventualmente a morte (MARCO et al., 1999).

Outros parâmetros físico-químicos da água também afetam o consumo alimentar dos camarões cultivados (NUNES et al., 1997) Diversos autores mostram como as variações da qualidade da água que influenciam o comportamento dos camarões. Santos et al. (2000) observaram um efeito inibitório na atividade de predação do *Farfantepenaeus paulensis* quando expostos a ambientes fechados contaminados com amônia e metais pesados. Robertson et al. (1993) registraram baixo crescimento do *L. vannamei* em altas salinidades, com redução no consumo alimentar, enquanto Wyban et al. (1995), trabalhando com a mesma espécie registraram mudanças significantes na ingestão de alimentos e no fator de conversão alimentar em baixas temperaturas. Wasielesky et al. (2003) reportaram variações significantes

no consumo alimentar de juvenis de *F. paulensis* em função de diferentes variáveis físico-químicas da água (temperatura, salinidade, amônia, nitrito e nitrato). Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos do nitrito sobre a sobrevivência, crescimento e consumo alimentar dos juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei*.

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo experimental foi realizado na Estação de Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil. Juvenis de *Litopenaeus vannamei*, obtidos de uma fazenda comercial do litoral Sul do estado de Pernambuco, foram transportados, aclimatados e mantidos em um tanque de fibra de vidro (1000 L) por uma semana, sob aeração constante, temperatura de 26-28 °C e salinidade de 25 g L⁻¹, com renovação diária de 5% do volume de água. A alimentação consistiu de ração comercial contendo 35 % proteína bruta, ofertada duas vezes por dia (9:00 e 17:00 horas), a uma taxa de 8% da biomassa inicial.

Após a aclimação, os camarões foram pesados (2,51±0,02 g), contados e distribuídos aleatoriamente nas unidades experimentais, numa densidade de 75 camarões m⁻² (15 camarões tanque⁻¹) e criados por um período de 30 dias. O estudo foi desenvolvido em 18 tanques de polietileno com área de 0,20 m² e volume útil de 30 L cada, providos de sistema de aeração individual e contínuo e mantido fotoperíodo natural. As unidades de cultivo foram abastecidas com água de salinidade 25 g L⁻¹ e mantidas em sistema de água clara, sem microalgas.

As concentrações de nitrogênio do nitrito foram obtidas por meio de uma solução estoque, preparada a partir da dissolução de 49,24 g nitrito de sódio P.A. em 1 L de água destilada para se obter uma concentração de 10.000 mg N-NO₂ L⁻¹. Foram utilizadas seis concentrações nominais de nitrogênio do nitrito (0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹, denominados de C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80, respectivamente), com três repetições

para cada tratamento. As concentrações reais de N-nitrito nas soluções testes foram medidos utilizando o método de diazotização (HACH #8507). Para manutenção das concentrações de nitrito, o volume útil dos tanques (100%) foi renovado a cada dois dias, e as soluções de N-nitrito adicionadas novamente. Diariamente, foi realizado o sifonamento das sobras de alimento e outros resíduos orgânicos nos tanques experimentais.

Os animais foram alimentados com ração comercial peletizada contendo 35% proteína bruta, fornecida em bandejas, uma vez ao dia (9:00 h) durante 30 dias de cultivo. Para avaliar o consumo alimentar, o alimento foi pesado e ofertado diariamente a uma taxa de 6,5% da biomassa dos camarões (JORY et al., 2001). Após 24h, as unidades experimentais foram sifonadas e filtrados em malha de 30 μm e, posteriormente lavadas para eliminação das fezes. Os restos de ração foram raspados e colocados em papel laminado pré-pesados e posteriormente levados à estufa a temperatura de 60°C, até atingir um peso constante. O consumo de alimento foi calculado com base na seguinte fórmula: $FC = (F_o - F_c) \times F_1$ (SOARES et al., 2005), onde FC = consumo de alimento (gramas de alimento por refeição), F_o = peso seco do alimento ofertado (g), F_c = peso do alimento ofertado (g) e F_1 = alimento perdido na água (%).

A cada cinco dias, foram realizadas biometrias com amostras equivalentes a 40% da população de cada parcela experimental. As taxas de mortalidades foram registradas diariamente e os camarões mortos foram retirados dos tanques de cultivo. A sobrevivência (S%), peso final (g), taxa de crescimento específico ($\% \text{ dia}^{-1}$), consumo alimentar e o comprimento das antenas dos camarões foram utilizados para avaliar os efeitos do nitrito ao final do experimento.

Durante o período experimental, a temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade da água foram verificados em cada tanque, duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h), com a utilização de multiparâmetro YSI 556 MPS (YSI Incorporation, Ohio, USA). A cada dois dias foram coletadas amostras de água de cada tanque para determinação das concentrações de

nitrogênio da amônia total (TAN), nitrogênio do nitrito (N-NO₂) e alcalinidade total (APHA, 1995). Previamente às análises, as amostras foram filtradas utilizando filtro analítico de 0,45 µm. Os compostos nitrogenados foram mensurados utilizando as versões dos métodos HACH TNT 830 (método salicilato) e 8507 (método de diazotização) para TAN e N-NO₂, respectivamente. As amostras foram lidas através de espectrofotômetro digital Hach DR 2800 (Hach Company, Colorado, USA).

As variáveis de crescimento dos camarões (peso inicial, peso final, sobrevivência, taxa de crescimento específico, consumo alimentar e comprimento das antenas), e os parâmetros de qualidade da água foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para determinar o efeito das concentrações de nitrogênio do nitrito, ao nível de significância de 5%. Havendo a necessidade, os dados de sobrevivência foram transformados por meio da função $\arcsen x^{0.5}$. Os testes de normalidade e homocedasticidade foram efetuados antes das análises para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias, ao nível de significância de 5% (ZAR, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros físicos e químicos da qualidade da água estão apresentados na Tabela 1. A média geral do oxigênio dissolvido entre os tratamentos foi $6,03 \pm 0,66$ mg L⁻¹ durante o período experimental. O valor médio registrado de pH foi de $7,97 \pm 0,12$, variando entre 7,32 e 8,67. Não foram encontradas diferenças significativas ($P \geq 0,05$) no oxigênio dissolvido e pH entre os tratamentos. A temperatura da água foi significativamente diferente entre os tratamentos ($P < 0,05$), apresentando uma média de $28,88 \pm 1,26$ °C. A salinidade média para os tratamentos foi de $25,99 \pm 0,72$ g L⁻¹, com mínima de 25,01 g L⁻¹ e máxima de 27,68 g L⁻¹. Esses parâmetros permaneceram dentro da faixa recomendada ao cultivo do *Litopenaeus vannamei* (VAN WYK e SCARPA, 1999; PONCE-PELAFOX et al., 1997).

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos para o nitrogênio da amônia e a alcalinidade. O nitrogênio da amônia total é gerado a partir da excreção e decomposição da matéria orgânica e, em elevadas concentrações, pode afetar negativamente o desempenho dos organismos cultivados, podendo ocasionar a mortalidade (LIN e CHEN, 2001). Em nosso estudo, as maiores concentrações do nitrogênio da amônia total (0,14 e 0,27 mg L⁻¹) foram registradas para os tratamentos C-60 e C-80, respectivamente (Tabela 1). Esses valores foram menores que o “nível seguro” estimado para criação de juvenis do camarão *L. vannamei* (0,16 mg L⁻¹ NH₃-N ou 3,55 mg L⁻¹ de TAN em 25 g L⁻¹ de salinidade) determinados por Lin e Chen (2001).

As maiores concentrações de alcalinidade total (105,45 e 104,17 mg CaCO₃ L⁻¹) foram registradas para os tratamentos C-60 e C-80 ($P < 0,05$). De acordo com Van Wyk e Scarpa (1999), o camarão *L. vannamei* precisa de uma alcalinidade maior que 100 mg CaCO₃ L⁻¹ para o desenvolvimento ideal. A alcalinidade total, registrada em nosso estudo, apresentou média de 99,11±11,95 mg CaCO₃ L⁻¹, variando de 65 a 120 mg CaCO₃ L⁻¹, durante o período experimental.

Os indicadores do desempenho zootécnico dos camarões após 30 dias de cultivo estão apresentado na Tabela 2. O peso inicial não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P \geq 0,05$). Para o cálculo do peso final, ganho de peso e taxa de crescimento específico para os tratamentos C-40, C-60 e C-80 foram considerados até o 26º, 18º e 10º dia de cultivo, respectivamente, quando essas parcelas não haviam atingido 100% de mortalidade. No presente estudo, o peso final (5,01 g) do tratamento controle (0 mg N-NO₂ L⁻¹) foi o dobro do peso inicial (2,5 g). Entretanto, o peso médio final dos tratamentos C-10 e C-20 (4,42 e 3,28 g) foram 1,77 e 1,30 vezes maior que o peso inicial. Foram registradas diferenças significativas no peso final ($P < 0,05$), com as menores médias (2,66, 2,50, e 2,57 g) registradas para os tratamentos com maiores concentrações de N-nitrito C-40, C-60 e C-80, respectivamente (Tabela 2). Campos et al. (2015) registraram diferenças significativas no

peso final dos camarões *Farfantepenaeus brasiliensis*, submetidos a toxicidade crônica de amônia, nitrito (valores) e nitrato. Os autores relataram que o peso final dos camarões foi negativamente influenciado pelas concentrações de 5,3 e 10,6 mg N-NO₂ L⁻¹ quando comparados ao grupo controle (0 mg N-NO₂ L⁻¹). Chen e Chen (1992) expuseram juvenis de *Penaeus monodon* a concentrações de nitrito de 2 a 20 mg N-NO₂ L⁻¹ por 60 dias e observaram que os camarões expostos as concentrações de 4, 8 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹ apresentaram peso final significativamente menor.

Os juvenis de *L. vannamei* apresentaram diferença significativa no ganho de peso entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os camarões expostos a concentrações de 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹ obtiveram ganho de peso significativamente inferiores ($P < 0,05$) aos expostos a concentrações de 20 e 10 mg N-NO₂ L⁻¹ e ao tratamento controle (0 mg N-NO₂ L⁻¹) após 30 dias de cultivo (Tabela 2). Campos et al. (2013) ao investigarem os efeitos da amônia, nitrito e nitrato no consumo alimentar de juvenis do camarão *F. brasiliensis*, observaram diferenças significativas no ganho de peso dos camarões submetidos às concentrações de 10,64 e 21,21 mg N-NO₂ L⁻¹ quando comparados aos tratamentos 5,36 e 0 (controle) mg N-NO₂ L⁻¹. Do mesmo modo, Furtado et al., (2015) avaliando o efeito da toxicidade do nitrato no crescimento e sobrevivência de juvenis de *L. vannamei* em sistema de bioflocos, reportaram que o ganho de peso foi significativamente mais baixo nos tratamentos 600 e 300 mg NO₃ L⁻¹ do que nos tratamentos 75 (controle) e 150 mg NO₃ L⁻¹.

O nitrito afetou negativamente o crescimento dos camarões. A taxa de crescimento específico (TCE) dos camarões expostos às concentrações de nitrito mais elevadas (20, 40, 60 e 80 mg NO₂ L⁻¹) foram significativamente ($P < 0,05$) mais baixas do que as registradas para os tratamentos com concentrações inferiores (0 – controle e 10 mg NO₂ L⁻¹) (Tabela 2). Foram registradas taxas de crescimento específico de 2,32, 1,89, 0,89, 0,18, 0,03 e 0,34 % dia⁻¹ para os tratamentos C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80, respectivamente. Os efeitos do nitrito no crescimento de camarões de água doce e dos peneídeos foram documentados por

Armstrong et al. (1976), Campos et al. (2013) e Campos et al. (2015). Armstrong et al. (1976) indicaram que 1,80 mg L⁻¹ de N-nitrito causou 35% de redução no crescimento de larvas de *Macrobrachium rosenbergii* em salinidades variando de 0,5-4 g L⁻¹ em 8,10 de pH a 28°C por 8 dias de exposição, quando comparados ao controle. Campos et al. (2013) registraram taxa de crescimento específico de 1,18 a 1,27 % dia⁻¹, com diferença significativa entre os tratamentos, ao avaliar os efeitos crônicos da amônia, nitrito e nitrato no consumo alimentar do camarão *F. brasiliensis*. Do mesmo modo, Campos et al. (2015) registraram taxas de crescimento de 1,53, 0,94 e 0,84 % dia⁻¹ para concentrações de 0-controle, 5,36 e 10,64 mg N-NO₂ L⁻¹, para juvenis do camarão *F. brasiliensis* cultivado por 40 dias na densidade de 120 camarões m⁻³. No presente estudo, foram registradas taxas de crescimento específico de 2,32, 1,89, 0,89, 0,18, 0,03 e 0,34 % dia⁻¹ para os tratamentos C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80, respectivamente.

Na maioria dos trabalhos são relatados a toxicidade do nitrito para camarões em valores de concentração letal - CL₅₀. Segundo Buikema et al. (1982), testes de toxicidade aguda podem fornecer informações sobre a letalidade de substâncias tóxicas, mas não podem prever a concentração que tem efeitos subletais e crônicos sobre os organismos. A sobrevivência foi negativamente influenciada pelas concentrações de nitrito ($P < 0,05$), tendo sua toxidez aumentada com o tempo de exposição e o aumento das concentrações (Figura 1). Após dois dias de cultivo, as taxas de sobrevivência foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Enquanto no tratamento controle (0 mg N-NO₂ L⁻¹) a sobrevivência foi de 100% durante todo o período experimental. No oitavo dia de cultivo, os tratamentos C-40, C-60 e C-80 apresentaram as taxas de sobrevivência foram significativamente mais baixas ($P < 0,05$) quando comparadas com os tratamentos C-0, C-10 e C-20. Nos tratamentos C-80 e C-60 a mortalidade foi de 100% no 10° e 18° dia de cultivo, respectivamente (Figura 1).

Ao final do cultivo, a sobrevivência média registrada foi 0,0 e 4,71% nos tratamentos C-60 e C-80 e C-40, respectivamente significativamente menores ($P < 0,05$) que os tratamentos

C-0 (controle), C-10 e C-20, que registraram sobrevivência média de 100, 93,75 e 93,75%, respectivamente (Tabela 2). As taxas de sobrevivência nos tratamentos C-0, C-10 e C-20, foram superiores aos encontrados por Gross et al. (2004), ao avaliarem a toxicidade crônica do nitrito para o camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em água com baixa salinidade (2 g L⁻¹), registrando sobrevivência média de 50% nas concentrações de 0, 1, 2 e 4 mg N-NO₂ L⁻¹ e 20% na concentração de 8 mg N-NO₂ L⁻¹, após dois dias de exposição ao N-nitrito e 21 dias de cultivo. Campos et al. (2015) registraram taxas de sobrevivência de 78, 68 e 59% ao cultivar o camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* (120 juvenis m⁻²) por 40 dias de exposição às concentrações de 0, 5,63 e 10,64 mg L⁻¹ de N-NO₂, respectivamente.

Correia et al. (2014) avaliando o efeito de duas rações comerciais (30 e 40% proteína bruta) em sistema de bioflocos registraram índices acima 82% na sobrevivência de pós-larvas de *L.vannamei* criadas em raceways (5000 PL m⁻³) por 60 dias, onde registraram concentrações máximas de 34 e 29 mg N-NO₂ L⁻¹. Lin e Chen (2003) ao avaliar a toxicidade aguda do nitrito em juvenis de *L. vannamei*, estimaram o nível de segurança de 15,2 e 25,7 mg N-NO₂ L⁻¹ em salinidades de 25 e 35 g L⁻¹.

Devido à mortalidade total nos tratamentos C-60 e C-80 não foram obtidos dados relacionados ao comprimento das antenas (cm) dos camarões. Ao final do período experimental, foram registrados comprimentos médios de 7,08, 5,08, 4,39 e 6,30 cm para os tratamentos C-0, C-10, C-20 e C-40, respectivamente. O comprimento das antenas do camarão é avaliado por ser um parâmetro indicativo de bem-estar e saúde geral do animal. Antenas quebradas e curtas são os primeiros sinais de comprometimento da saúde do camarão (NEW et al., 2010). Não foram encontradas diferenças significativas ($P \geq 0,05$) para esta variável entre os tratamentos nas concentrações mais baixas (0, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹). Kuhn et al. (2010) ao avaliar a toxicidade crônica do nitrato em juvenis de *L. vannamei* cultivado reportaram que o comprimento das antenas dos camarões foi negativamente influenciado pelos níveis mais elevados de nitrato (435 e 910 mg NO₃ L⁻¹). Do mesmo modo,

Furtado et al. (2015) verificaram que houve redução significativa no comprimento das antenas dos camarões sob concentrações de 300 e 600 mg L⁻¹ de nitrato.

O consumo de ração pelos juvenis de *L. vannamei* variou entre 1,38 a 0,12 g/g/dia (Figura 2) e foi afetado pela maior concentração de nitrito, sendo o tratamento C-80 diferente significativamente ($P < 0,05$) dos demais. Os níveis mais elevados de nitrito apresentaram variação significativa em relação aos tratamentos C-0, C-10 e C-20 (0,10 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹), diminuindo o consumo alimentar do *L. vannamei* em concentrações acima de 40 mg N-NO₂ L⁻¹. Segundo Kuhn et al. (2010), em elevadas concentrações de nitrogênio alguns processos fisiológicos dos camarões são prejudicados, dentre eles a osmorregulação e a respiração, resultando em baixo consumo alimentar, baixa taxa de crescimento específico ou mesmo mortalidade dos camarões.

Wasielesky et al. (2003) em estudo com o camarão-rosa *F. paulensis*, observaram relação negativa entre concentrações de nitrito e consumo alimentar, mesmo com apenas 15 dias de exposição. Campos et al. (2013) ao investigarem os efeitos dos compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) sobre o consumo alimentar do camarão *F. brasiliensis*, registraram baixo consumo alimentar para os animais expostos às concentrações de nitrito (5,36, 10,64 e 21,21 mg N-NO₂ L⁻¹) quando comparados ao grupo controle (0 mg N-NO₂ L⁻¹). Segundo Tahon et al. (1988), o efeito do nitrito sobre os pigmentos respiratórios e a capacidade de captação e transporte de oxigênio na hemolinfa podem ser associados à diminuição nas taxas de consumo alimentar, uma vez que causariam a redução do metabolismo aeróbico dos camarões.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a sobrevivência e o consumo alimentar dos camarões não foram comprometidos em concentrações de até 20 mg N-NO₂ L⁻¹.

Entretanto, nas concentrações mais elevadas, o crescimento, a sobrevivência e o consumo alimentar do camarão *Litopenaeus vannamei* foram afetados. Em sistema de água clara, é possível cultivar o camarão em concentrações até 20 mg N-NO₂ L⁻¹, por um período de 30 dias, sem comprometer a sobrevivência e o consumo alimentar.

AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) no âmbito do Programa Nacional de Carcinicultura (RECARCINA), pelo suporte financeiro. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Pós-Graduação. À Fazenda Costa Dourada Camarões Ltda, pelo fornecimento dos camarões.

REFERÊNCIAS

- American Public Health Association (APHA), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. APHA, Washington, DC, USA. 1995. 1082 p.
- ALCARAZ, G.; CHIAPPA-CARRARA, X.; VANEGAS, C. Temperature tolerance of *Fenaeus setiferus* postlarvae exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology*. v.39, n. 3-4, p.345-353, 1997.
- ARMSTRONG, D. A.; STEPHENSON, M. J.; KNIGHT, A. W. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, v.9, n.1, p.:39-46, 1976.
- BOUWMAN, A.F., PAWLOWSKI, M., LIU, C., BEUSEN, A.H.W., SHUMWAY, S. E., GILBERT, P.M., OVERBEEK, C.C. Global hindcasts and future projections of coastal nitrogen and phosphorous loads due to shellfish and seaweed aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, v.19, p. 331–357, 2011.

BUIKEMA, A.L.; NIEDERLEHNER, R.R.; CAIRNS, J.J. Biological monitoring Part IV. Toxicity testing. *Water Reserch*, v.16, p.239-262, 1982.

CAMPOS, B.R.; FURTADO, P.S.; D'INCAO, F.; WASIELESKY, W.; POERSCH, L.H.S. Compostos nitrogenados sobre o consumo alimentar de camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, p.2202-2207, 2013.

CAMPOS, B.R.; FURTADO, P.S.; D'INCAO, F.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. The chronic toxicity of ammonia, nitrite and nitrate on juvenile *Farfantepenaeus brasiliensis* (Crustacea: Decapoda). *Boletim do Instituto de Pesca*. v.41, n.2, p.261–269, 2015.

CHEN, J.C.; CHEN, S.F. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology C.*, v.101, n.3, p.453-458, 1992.

CHEN, J.C., WANG, T.C., 1990. Culture of tiger shrimp and red-tailed shrimp in a semi-static system. In: Hirano,R., Hanyu, I. (Eds.), *The Second Asian Fish. Forum*, Asian Fish Society, Tokyo, Japan, pp. 77 – 80.

CHENG, S.Y., CHEN, J.C. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology*, v.45, n.1, p.35-46, 1999.

CORREIA, E.S.; WILKENFELD, J. S.; MORRIS, T.C.; WEI, L.; PRAGNELL, D.I.; SAMOCHA, T.M. Intensive nursery production of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in biofloc-dominated system. *Aquacultural Engineering*, Oxford, v.59, p.48-54, 2014.

EBELING, J.M.; TIMMONS, M.B.; BISOGNI, J.J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 257, p. 346-358, 2006.

FAO (Food Agriculture Organization of the United Nations). *Aqua-culture topics and activities. Trends in aquaculture production*. Text by Alan Lowther and Stefania Vannuccini. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* . Rome: FAO (2011).

FURTADO, P.S.; CAMPOS, B.R.; SERRA, F.P.; KLOSTERHOFF, M.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY JR., W. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*, v.23, p.315-327, 2015.

GROSS, A.; ABUTBUL, S.; ZILBERC, D. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, v.35, P.315-321, 2004.

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

JORY, D.E.; CABRERAS, R.T.; DURWOOD, M.D.; FEGAN, D.; LEE, G.P.; LAWRENCE, A.L.; JACKSON, J.C.; MCINTOSH, P.R.; CASTANEDA, A.J. (2001) A global review of shrimp feed management: status and perspectives. *Aquaculture*, the World Aquaculture Society, Baton Rouge

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

KUHN, D. et al. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture*. Amsterdam, v.309, p.109-114, 2010.

LIN, Y.C.; CHEN, J.C. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.259, p.109–119, 2001.

LIN, Y.C.; CHEN, J.C. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, Amsterdam, v.224, p.193-201, 2003.

MARCO, A.; BLAUSTEIN, A.R. The effects of nitrite on the behavior and metamorphosis in cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.18, n.5, p.946–949, 1999.

MARCO, A.; QUILCHANO, C.; BLAUSTEIN, A.R. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific northwest, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.18, n.12, p.2836–2839, 1999.

NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D'ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N.; 2010. *Freshwater Prawns: Biology and Farming* 1st edition. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, West Sussex, United Kingdom.

NUNES, A.J.P., GESTEIRA, T.C.V., GODDARD, S. Food consumption and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*, v. 149, p 121-136. 1997

PHILIPS, S., LAANBROCK, H. J., VERSTRAETE, W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. A review. *Reviews Environmental Science and Biotechnology*., v.1, n.2, p.115–141, 2002.

PONCE-PALAFIX, J.P. The Effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, Amsterdam, v.157, p.107-115, 1997.

ROBERTSON, L., LAWRENCE, A.L., CASTILLE, F. Interaction and salinity and feed protein levels on growth of *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture*, v.2, n.1, 43-54, 1993.

ROMANO, N., ZENG, C. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, v.21, n.1, p.1–21, 2013.

SANTOS, M.H.S., CUNHA, N.T. BIANCHINI, A. Effects of copper and zinc on growth, feeding and oxygen consumption of *Farfantepenaeus paulensis* post larvae (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. v.247, n.2, 233-242, 2000.

SOARES, R.; WASIELESKY, W.; PEIXOTO, S.; D'INCAO, F. Food consumption and gastric emptying of *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture*, v.250, n.1-2, p.283-290, 2005.

TAHON, J.P.; VAN HOOFF, D.; VINCKIER, C.; WITTERS, R.; DE LEY, M.; LONHE, R. The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *Biochemical Journal*. v.249, n.3, p.891-896, 1988.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water quality and management. In: VAN WYK P et al (eds) Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida department of agriculture and consumer services, Tallahassee, pp 128–138, 1999.

WASIELESKY JR, W., BIACHINI, A., SANCHEZ, C.C., POERSCH, L.H. The effect os temperature, salinity and nitrogen products on food consumption of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v.48, n.1, 135-141, 2003.

WU, J.P.; CHEN, H.C. Effects of cadmium and zinc n growth, food consumption, and nutritional conditions of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v.74, n.2, p.234-241, 2005.

WYBAN, J.; WALSH, W.A.; GODIN, D.M. Temperature effects on growth, feeding rate and conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. v.138, n.1-4, p.267-279, 1995.

ZAR, J.H., *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey. 1996. 622p.

Tabela 1. Efeito das diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito sobre as variáveis de qualidade da água durante o período experimental (média±desvio padrão).

Variáveis	Concentrações de N-NO ₂ (mg L ⁻¹)					
	C-0	C-10	C-20	C-40	C-60	C-80
Temperatura (°C)	29,3±1,39 ^a	28,8±1,10 ^b	28,8±1,23 ^{bc}	28,44±1,15 ^c	28,59±1,12 ^{bc}	28,46±1,36 ^{bc}
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	5,68±0,57 ^a	5,91±0,60 ^a	5,99±0,58 ^a	6,13±0,61 ^a	6,41±0,61 ^a	6,85±0,59 ^a
pH	7,91±0,12 ^a	7,92±0,11 ^a	7,97±0,09 ^a	8,04±0,09 ^a	8,04±0,11 ^a	7,93±0,16 ^a
Salinidade (g L ⁻¹)	26,01±0,72 ^a	26,03±0,77 ^a	26,08±0,79 ^a	26,02±0,75 ^a	25,75±0,49 ^b	25,77±0,33 ^b
NAT (mg L ⁻¹)	0,06±0,06 ^a	0,08±0,05 ^a	0,08±0,05 ^a	0,09±0,05 ^a	0,14±0,17 ^b	0,27±0,16 ^b
N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	0,06±0,05	10,09±0,88	20,33±1,10	39,41±1,64	59,13±2,24	80,12±6,30
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	96,43±9,51 ^a	97,62±13,84 ^a	98,57±13,24 ^a	99,05±11,79 ^a	105,45±11,28 ^b	104,17±7,36 ^b

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. Tratamentos: C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80 correspondem a 0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹. NAT – nitrogênio da amônia total; N-NO₂ – nitrogênio do nitrito.

Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito sobre o desempenho do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado durante 30 dias (média±desvio padrão).

Concentrações (mg N-NO ₂ L ⁻¹)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)	TCE (% dia ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Comprimento da antena (cm)
C-0	2,50±0,00 ^a	5,01±0,11 ^a	2,51±0,10 ^a	2,32±0,07 ^a	100,0±0,00 ^a	7,08±2,40 ^a
C-10	2,51±0,02 ^a	4,42±0,09 ^a	1,91±0,10 ^b	1,89±0,08 ^a	93,75±6,25 ^a	5,08±1,51 ^a
C-20	2,51±0,02 ^a	3,28±0,13 ^a	0,77±0,14 ^c	0,89±0,15 ^b	93,75±10,83 ^a	4,39±1,04 ^a
C-40	2,52±0,02 ^a	2,66±0,40 ^b	0,14±0,39 ^d	0,18±0,55 ^{bc}	4,71±7,22 ^b	6,30±2,55 ^a
C-60	2,51±0,02 ^a	2,50±0,11 ^b	0,01±0,22 ^d	0,03±0,22 ^c	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
C-80	2,49±0,00 ^a	2,57±0,04 ^b	0,09±0,05 ^d	0,34±0,18 ^{bc}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. Tratamentos: C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80 correspondem a 0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹. TCE – Taxa de crescimento específico = $100 \times (\ln Pf - \ln Pi) / T$; Pi – peso inicial, Pf – peso final, T – tempo de cultivo. Tempo de cultivo de 26, 18 e 10 dias para os tratamentos C-40, C-60 e C-80, respectivamente.

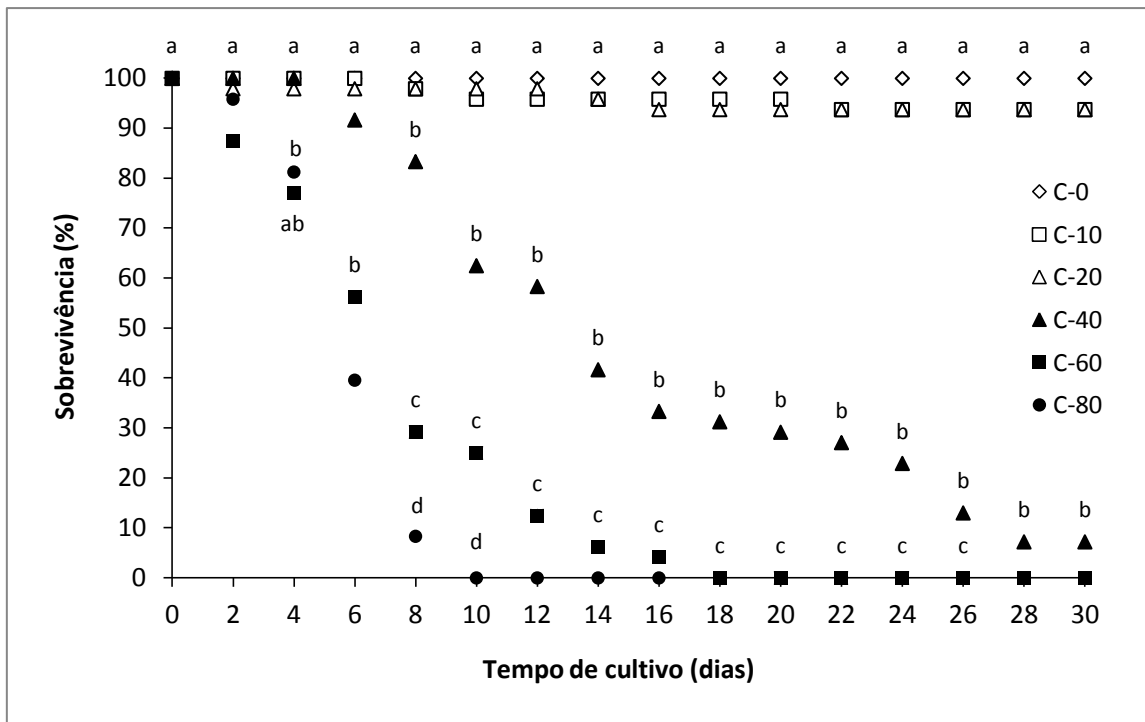


Figura 1. Sobrevivência média dos juvenis de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de N-nitrito. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). Tratamentos: C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80 correspondem a 0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹.

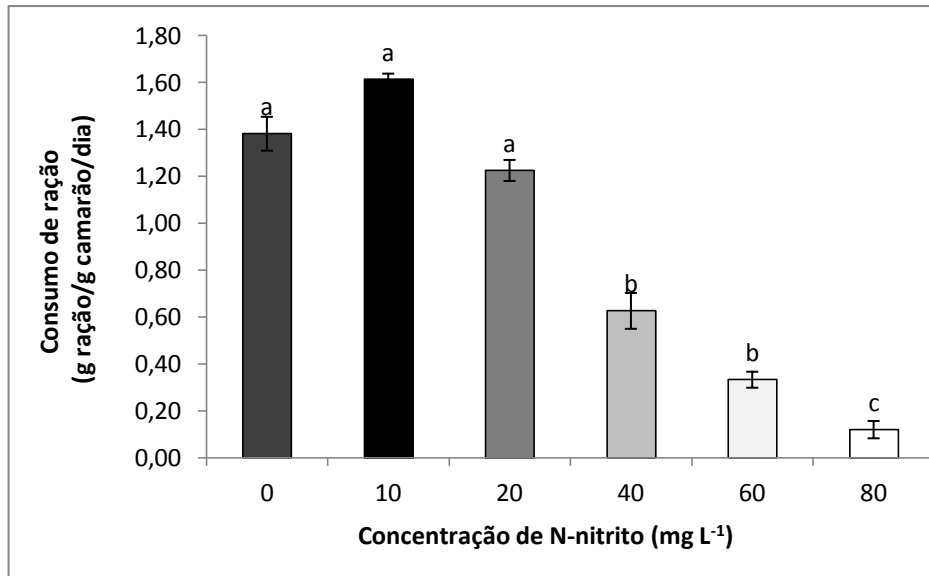


Figura 2. Consumo de ração por juvenis de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de N-nitrito. Os dados são as média±desvio padrão. Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais entre si ($P < 0,05$). Tratamentos: C-0, C-10, C-20, C-40, C-60 e C-80 correspondem a 0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹.

Anexo I – Normas da Revista

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados preferencialmente em idioma Inglês. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1ª rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso não traduzidos nesta etapa e se aprovados para publicação, terão que ser obrigatoriamente traduzidos para o Inglês por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR. As despesas de tradução serão por conta dos autores. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. O preenchimento do campo "cover letter" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, exceto para artigos submetidos em português (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?

d) The most important conclusions that can be drawn from your research?

e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

10.1. Citação de livro: JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

10.2. Capítulo de livro com autoria: GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

10.3. Capítulo de livro sem autoria: COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

10.4. Artigo completo: O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

10.5. Resumos: RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

10.6. Tese, dissertação: COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

10.7. Boletim:ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

10.8. Informação verbal:Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

10.9. Documentos eletrônicos:MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em:<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

11. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

12. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decurso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.

20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa "Cross Check".