

LIMITES DE TOLERÂNCIA TÉRMICA E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS DE *Phalloceros caudimaculatus* (HENSEL, 1868)
ACLIAMATADOS À DIFERENTES TEMPERATURAS

LUIZ FERNANDO BARBI DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

LIMITES DE TOLERÂNCIA TÉRMICA E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS DE *Phalloceros caudimaculatus* (HENSEL, 1868)
ACLIAMATADOS À DIFERENTES TEMPERATURAS

LUIZ FERNANDO BARBI DE SOUZA

PROF. DR. RAFAEL MENDONÇA DUARTE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção
do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

São Vicente - SP
2022

S7291

Souza, Luiz Fernando Barbi de

LIMITES DE TOLERÂNCIA TÉRMICA E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS DE *Phalloceros caudimaculatus* (HENSEL, 1868)
ACLIAMATADOS À DIFERENTES TEMPERATURAS / Luiz
Fernando Barbi de Souza. -- São Vicente, 2022
65 p. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Rafael Mendonça Duarte

1. Fisiologia. 2. Tolerância Térmica. 3. Resposta Fisiológicas. 4.
Aclimação. 5. Temperatura. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.

Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



Câmpus do Litoral Paulista

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUIZ FERNANDO BARBI DE SOUZA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Aos 23 dias do mês de março do ano de 2022, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUIZ FERNANDO BARBI DE SOUZA, intitulada **Limites de tolerância térmica e respostas fisiológicas de *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) aclimatados à diferentes temperaturas.** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Instituto de Biociencias Campus do Litoral Paulista / UNESP, Profa. Dra. TÂNIA MARCIA COSTA (Participação Virtual) do(a) Instituto de Biociencias Campus do Litoral Paulista / UNESP, Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES (Participação Virtual) do(a) Curso de Engenharia de Pesca / UNESP, Campus de Registro, Registro-SP. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE

AGRADECIMENTOS

Na construção da presente dissertação tive apoio das pessoas que me cercam, principalmente a minha esposa e as minhas filhas. Sou grato pela ajuda, compreensão, paciência, amor e apoio incondicional. Vocês são a base de tudo isso e com certeza sem vocês eu não estaria aqui hoje....

Gostaria de agradecer meus familiares, principalmente aos meus pais, Célio Pedro de Souza e Helena Barbi de Souza. Esses, sempre lutaram pela minha educação e me motivaram a sempre estudar, zelaram com todo cuidado e muito amor pelo meu bem estar, sempre me ensinaram a superar todas as dificuldades impostas pela vida, minha infinita gratidão.

Meus Avós em particular aos avós maternos, que estimo tanto, Barbara Mack Barbi e João Barbi pela rica contribuição na minha formação cultural, assim como minha tia Anne Barbi, familiares que despertaram o desejo de viver perto do mar e entender o funcionamento da natureza. Minha infinita gratidão a eles e a todos os meus antepassados. Sou infinitamente grato pelo alicerce deixado que permanece até hoje, rico em ensinamentos e exemplos de superação, que motivam a enfrentar qualquer adversidade da vida. Por eles e com eles alcanço todos meus objetivos.

Ainda se tratando da minha família, em meio a um dos meus grandes passos acadêmicos, agradeço à minha esposa Fernanda e minhas filhas Ana Clara e Ana Beatriz, que me fazem progredir em muitos aspectos. Elas me ensinaram a aproveitar e valorizar os momentos e as oportunidades, a aumentar minha produtividade e organização e, principalmente, a amar a vida cada vez mais. E, em meio as tribulações da pandemia e da dissertação.

Agradeço meu orientador, Professor Doutor Rafael Mendonça Duarte, por acreditar no meu desejo de continuar no caminho da ciência, pelos seus inestimáveis ensinamentos e aperfeiçoamentos que me proporcionou e pela credibilidade, dedicação, liberdade, paciência e confiança depositada em mim. Por sempre incentivar a conquista de novos conhecimentos, pelas palavras sábias, pelo exemplo profissional, pela amizade e pelas enriquecedoras conversas. Pelas aulas como aluno ouvinte e posteriormente as inúmeras horas-aulas no estágio de docência, serei eternamente grato.

Ao meu amigo, Guilherme Ramos Panizza, aluno de graduação da universidade e membro do laboratório LECTA/CLP UNESP, pelo grande apoio durante todo período de mestrado compreendendo também o período de pandemia da Covid-19 até a data atual. Um companheiro sempre atencioso, prestativo que me ajudou desde o início a realizar as tarefas do

mestrado. Agradeço infinitamente pela sua ajuda e esforço, pelo apoio nas coletas, viagens, nos testes laboratoriais, especialmente o de “Amônia”, no auxílio, manutenção e montagens dos sistemas e análises estatísticas. Foram infinitos os momentos de alegria e descontração vividos dentro e fora do laboratório, minha eterna gratidão.

Posso exaltar minha gratidão aos meus colegas de laboratório e amigos do CLP Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal (LABECOM) e Laboratório de Aquicultura Sustentável (LAS), que não mediram esforços para ajudar nos trabalhos experimentais. Também enalteço meu agradecimento aos Professores do CLP, Dr^a. Tânia Marcia Costa, Dr. Ivan Sergio Nunes Silva Filho, Dr^a. Alessandra S. Augusto, Dr. Milton Costa Lima Neto, Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, Dr. Leandro Mantovani de Castro, que gentilmente cederam materiais, tempo e seus laboratórios e equipamentos para realização dos experimentos e para a concretização desse trabalho. Ao Professor Dr. Eduardo Antônio Sanches, da Unesp de Registro pelo apoio nas coletas e valioso auxílio com equipamentos e sua avaliação na qualificação; e ao Dr. Fernando Rafael De Grande (UNESP/Botucatu) pela gentileza no LABCOM e grande contribuição na minuciosa avaliação do trabalho na qualificação.

À empresa *Nutricom* pelo fornecimento de alimento aos nossos animais, e pelo fornecimento de alguns produtos para manutenção dos aquários.

À banca examinadora, por aceitarem o convite e me concederem a honra de sua presença nesta defesa de dissertação. Por serem referência e exemplo de profissionais.

Aos demais integrantes do LABCOM pela grande ajuda na utilização do laboratório úmido e da sala de equipamentos de termoregulação. Agradeço também pelas orientações, incentivo, pelas conversas enriquecedoras e valiosas dicas durante esse período do mestrado.

Agradeço a tia Sandra e sua filha Carol pelo carinho em servir as refeições na cantina do CLP e que certamente fizeram toda a diferença no meu estado emocional e físico durante esse período.

Ao programa de Pós-graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros, pelo excelente trabalho e dedicação.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação que contribuiu para meu enriquecimento científico neste curto período.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação que sempre esclareceu todas as dúvidas prontamente, neste momento de Pandemia.

Em resumo, minha dissertação colaborou muito para meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal. Sou extremamente grato pela inestimável riqueza de conhecimento.

OBRIGADO!!!

“Seguirei para o amanhã agarrado aos braços da inteligência, amparado pela força de vontade e pelo respeito; buscando a todo custo a felicidade.”

Luiz Fernando Barbi de Souza

RESUMO

A temperatura é um dos fatores abióticos que mais têm influência na fisiologia de organismos ectotérmicos aquáticos. A determinação da temperatura crítica máxima (CTM_{áx}) e a avaliação do metabolismo são ferramentas importantes na compreensão dos limites fisiológicos dos peixes e de suas respostas frente ao estresse térmico. Em nosso estudo avaliamos os limites de Tolerância Térmica Crítica Máxima (CTM_{áx}) e respostas do metabolismo (consumo de oxigênio, excreção de nitrogênio, fluxo iônico líquido de cloreto e sódio) em indivíduos da espécie *Phalloceros caudimaculatus*. Os animais, com peso médio de $0,670 \pm 0,119$ g, ficaram durante 7 dias nas temperaturas de aclimação (20-25-30°C). Avaliamos a CTM_{áx} na salinidade 6‰ ($38,567 \pm 0,207$, $39,833 \pm 0,111$ e $41,756 \pm 0,194$) e a CTM_{áx} na salinidade 11‰ ($39,138 \pm 0,172$, $39,983 \pm 0,06$ e $41,057 \pm 0,121$), em cada um dos regimes térmicos selecionados, respectivamente. Houve variação significativa entre as temperaturas de aclimação no CTM_{áx} ($P < 0,05$). Não houve um aumento nas taxas de consumo de oxigênio em função do aumento nas temperaturas de aclimação (20-25-30°C), e as taxas médias foram de ($263,497 \pm 43,338$, $217,892 \pm 61,594$, $287,803 \pm 28,248$), respectivamente. O valor do coeficiente de temperatura (Q_{10}) calculado entre as temperaturas de 20-30°C foi (Q_{10}) = 1,24. Na excreção de amônia foi observada diferenças estatísticas entre 25-30°C e 20-30 °C ($P < 0,05$). Não foi observada diferenças estatísticas significativas na excreção de amônia entre 20-25°C ($P = 0,259$). O fluxo líquido de cloreto (J^{Cl}_{net}) não apresentou diferenças significativas entre as diferenças temperaturas de aclimação ($P = 0,261$). Por outro lado, o fluxo líquido de sódio (J^{Na}_{net}), foi significativamente aumento em 25°C ($-48,607 \pm 10,05$), em comparação com os demais regimes térmicos testados. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no fluxo líquido de sódio entre as temperaturas de 20-30°C ($P = 0,261$). Nossos resultados indicam que o aumento da temperatura de aclimação resulta no aumento do limite máximo de tolerância térmica (como indicado pela CTM_{áx}) e redução da capacidade de aclimação térmica de *Phalloceros caudimaculatus*, promovendo pequenos distúrbios na excreção de produtos nitrogenados e balanço de Na^+ nos animais.

Palavras chaves: temperatura, tolerância, aclimação, salinidade, estresse.

ABSTRACT

Temperature is one of the abiotic factors that most influence the physiology of aquatic ectothermic organisms. The determination of the maximum critical temperature (CTMax) and the assessment of routine metabolism are important tools to understanding the physiological limits of fish and their responses to heat stress. In our study, we evaluated the limits of Maximum Critical Thermal Tolerance (CTMax) and metabolic responses (oxygen consumption, nitrogen excretion and net ion fluxes of chloride and sodium) in individuals of the species *Phalloceros caudimaculatus*, weighing. The animals weighting in average 0.670 ± 0.119 g were kept for 7 days in three thermal regimes (20-25-30°C). We evaluated the CTMax at salinity 6‰ (38.567 ± 0.207 , 39.833 ± 0.111 and 41.756 ± 0.194) and the CTMax at salinity 11‰ (39.138 ± 0.172 , 39.983 ± 0.06 and 41.057 ± 0.121), at each thermal regime selected, respectively. There was a significant variation in CTMax between the three temperatures acclimation ($P < 0.05$). No statistically significant differences were observed in routine oxygen consumption with the increment in temperature. The value of the temperature coefficient (Q10) calculated between 20-30°C was $(Q10) = 1.24$. Regarding to the ammonia excretion, there is statistical differences between temperature acclimation of 25-30°C and 20-30°C ($P < 0.05$). No statistically significant differences were observed in ammonia excretion between 20-25°C ($P = 0.259$). The net chloride flux (J^{Cl}_{net}) was not statistically different between the acclimation temperatures tested ($P = 0.261$). On the other hand, sodium net fluxes sodium (J^{Na}_{net}) was significantly increased at 25°C (-48.607 ± 10.05) compared to 20 and 30°C. However, no differences were seen in J^{Na}_{net} between the acclimation temperatures of 20-30°C ($P = 0.261$). The results indicate that increases in temperature acclimation promote the increase of maximum thermal limits (as seen as by CTMax) and reduce the thermal acclimation capacity of *Phalloceros caudimaculatus*, also resulting in smaller disturbances in both the excretion of nitrogenous waste products and Na^+ balance in animals.

Key words: temperature, tolerance, acclimatization, salinity, stress.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** – Exemplar de *Phalloceros caudimaculatus*..... 24
- FIGURA 2.1.** – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Ilha Comprida (SP) identificando o local onde fica a balsa do município de Cananeia. SP-Brasil..... 25
- FIGURA 2.2.** – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Ilha Comprida (SP). 25
- FIGURA 2.3.** – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Ilha Comprida (SP) vista aproximada do ponto de coleta.26
- FIGURA 2.4.** – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Praia de Fora, Ilha Comprida – litoral Sul – SP –Brasil (25°00'00.6"S 47°86'52.1"W) . Cerca de 4 h 3 min, (253 km) via BR-101 e BR-116 de distância do Instituto de Biociências – Câmpus do Litoral Paulista – Unesp – São Vicente. (A) A face sudeste, voltada para praia, é formada por área plana. (B) A face leste e oeste, faixa de areia e vegetação. (C) Amostras de *P. caudimaculatus* em poças de maré. (D) A face nordeste, o continente, com moradias.26
- FIGURA 2.5.** – Ponto coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Praia de Fora, Ilha Comprida. (A) Acondicionamento dos animais em sacos com oxigênio para o transporte ao Câmpus do Litoral Paulista (B) Atividade de coleta com rede, cercando os peixes no capim onde esses animais ficam refugiados e protegidos. (C) Equipamento Multiparâmetro (pH/Cond./OD/Temp.) - AK88 (D) Verificação dos parâmetros pH, oxigênio dissolvido, condutividade do ambiente nas poças de maré. Fonte: Manual do equipamento. https://www.akso.com.br/produto/ph-do-solo/multiparametro_ph_cond_od_temp_ak_88-238 (E) Verificação da salinidade com Medidor de (Instant ocean Hydrometer). 27
- FIGURA 3.** – Diagrama demonstrando os passos do ensaio para a determinação da temperatura crítica (CTMáx).30
- FIGURA 4.** – (A) Equipamento de banho Ultratermostático Microp. com circ. - Q214M (Quimis) . (B) Verificação de temperatura e pH, (PHMETRO de bancada com ATC. PH0-14). (C) Controlador de temperatura Stc-3008 Termostato e Controlador de temperatura duplo, ligados a termostatos eletrônicos 50 Watts e equipamentos de areação e recirculação (Compressor De Ar Maxxi Power Pro-9000). (D) Peixes *P. caudimaculatus* colocado para reduzir período de estresse (30 min). (E) e (F) *P. caudimaculatus* em situação de estresse térmico na (CTMáx) próximo a perda do equilíbrio natatório end point (loss of equilibrium – LOE) (Beitinger et al., 2000).30
- FIGURA 5.** – (A) Banho ultratermostático microp. com circ. - Q214M (Quimis) (B) termostato TIC-17RGTi - Full Gauge Controls (Full Gauge) (C) *Phalloceros caudimaculatus* (D) Compressor De Ar Maxxi Power Pro-9000 3w A 6w 220v Spid Fish.31
- FIGURA 6.** – Experimento de Consumo de Oxigênio, (A) termostatos TIC-17RGTi - Full Gauge Controls (Full Gauge) (B) Compressor De Ar Maxxi Power Pro-9000 3w A 6w 220v Spid Fish (C) Oxímetro (A) bandeja com recipiente de 200ml (D) realizando a verificação do oxigênio.32

FIGURA 7. – (A) *P. caudimaculatus* período para reduzir estresse (120 min). (B) Equipamento para verificar pH e temperatura no início e fim do experimento. (C) *P. caudimaculatus* após os experimentos. (D) *P. caudimaculatus* no fim do experimento após 8h, verificação do peso. (E) Animal no final do experimento. (F) Equipamentos: câmara de plástico com (200ml), areação e recirculação feita com cateter de polietileno, período de trocas parciais de água para o início do experimento. (G) Experimento 20°C com refrigeração. (F) Experimento 25°C (F) Experimento 30°C estoque e controladores de temperatura para garantir precisão.33

FIGURA 8. – Efeito da temperatura de aclimação sobre a temperatura crítica máxima (CTM_{áx}) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 (barras pretas) e 11 ‰ (barras cinzas). (média ± SEM). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças na CTM_{áx} entre as temperaturas de aclimação nos peixes mantidos a 6 ‰, enquanto letras minúsculas diferentes representam diferenças na CTM_{áx} entre as temperaturas de aclimação dos animais mantidos a 11 ‰. Asteriscos (*) representam diferenças na CTM_{áx} entre as duas salinidades testadas, em uma mesma temperatura de aclimação. (Anexo III).36

FIGURA 9. – Efeito da temperatura de aclimação sobre a capacidade de aclimação térmica (CAT) (Acclimation response ratio ARR) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 (barras pretas) e 11 ‰ (barras cinzas). (média ± SEM). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças na CAT entre as temperaturas de aclimação nos peixes mantidos a 6 ‰, enquanto letras minúsculas diferentes representam diferenças na CAT entre as temperaturas de aclimação dos animais mantidos a 11 ‰. Asteriscos (*) representam diferenças na CAT entre as duas salinidades testadas, em uma mesma temperatura de aclimação. (Anexo III).37

FIGURA 10. – Efeito da temperatura de aclimação sobre a taxa de consumo de oxigênio (VO₂ mg O₂/kg/h) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 ‰. (média ± SEM). O valor do coeficiente de temperatura (Q₁₀) calculado entre as temperaturas de 20°C-30°C está notado acima na figura. (Anexo III).38

FIGURA 11. – Efeito da temperatura de aclimação sobre a taxa de excreção de amônia (J_{Amm}) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 ‰. (média ± SEM). Letras diferentes representam diferenças no J_{Amm} entre as temperaturas de aclimação. (Anexo III).39

FIGURA 12. – Efeito da temperatura de aclimação sobre os fluxos líquidos de sódio (J_{Nanet}) (A) e de cloreto (J_{Clnet}) (B) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 ‰. (média ± SEM). Letras diferentes representam diferenças no fluxo líquido dos íons entre as temperaturas de aclimação. (Anexo III).40

LISTA DE TABELAS

ANEXO – I Tabela 1. Parâmetros do local da coleta de <i>Phalloceros caudimaculatus</i>	66
ANEXO – II Tabela 2. Características físico-químicas da água medida ao longo do período experimental (CTMáx).	67
ANEXO – III Tabela 3. Tolerância crítica termal (CTMáx), Capacidade de aclimação térmica (CAT) (Acclimation response ratio ARR), consumo de oxigênio, Q10, excreção de amônia, fluxo líquido de cloreto e sódio de <i>Phalloceros caudimaculatus</i> aclimatados por uma semana em diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) em salinidades (6‰).	68
ANEXO – IV Tabela 4. Os valores médios de temperatura (°C) e pH de <i>P. caudimaculatus</i> na primeira e segunda série experimental nas temperaturas de aclimação 20, 25, 30°C na CTMáx, em duas salinidades (6‰) e (11‰). Os valores médios do peso (g) de <i>P. caudimaculatus</i> na série experimental consumo de oxigênio em 20,25, 30°C e salinidade 6‰.	69
ANEXO – V Fig.1. Variação na temperatura de aclimação de <i>Phalloceros caudimaculatus</i> por 7 dias as temperaturas de 20, 25, 30°C, nas salinidades de (6‰) e (11‰).	70

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

-(CAT)	<i>Acclimation response ratio</i> _ARR
-NH ₃	Amônia não ionizada
- CC	Células de cloreto
-Q10	Coefficiente de temperatura
- NaCl	Cloreto de sódio
- Jout	Efluxo
- EP	Erro padrão
- (<i>J</i> _{Amm_N})	Excreção de amônia
- <i>J</i> _{net}	Fluxo líquido
- (<i>J</i> _{net} ^{Cl})	Fluxo líquido de cloreto
- (<i>J</i> _{net} ^{Na})	Fluxo líquido de sódio
- g	Gramas
- g/dL	Gramas por decilitro
- °C	Graus celsius
- h	Horas
- <i>J</i> _{in}	Influxo
- NH ₄ ⁺	Íon amônio
- HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
- Cl ⁻	Íon cloreto
- H ⁺	Íon hidrogênio
- Na ⁺	Íon sódio
-LAS	Laboratório de Aquicultura Sustentável
-LECTA	Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia Aquática
-LABECOM	Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal
- L	Litros
- µl	Micro litro
- mg	Miligramas
- ml	Mililitros
- mm	Milímetros
- ppm	Partes por milhão
-PP	Polipropileno
- pH	Potencial hidrogeniônico
-ILT	Temperatura letal incipiente
- <i>V</i> O ₂	Taxa de consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivos Gerais	223
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Animais Experimentais e caracterização do ponto de coleta	24
3.2 Aclimação.....	27
3.3. Determinação dos limites de tolerância térmica máxima (CTMáx).....	28
3.4. Determinação do consumo de oxigênio e respostas ionoregulatórias	331
3.5. Técnicas Analíticas e Cálculos	33
3.6. Análise Estatística	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	411
5.1. Efeitos da temperatura e salinidade na tolerância térmica de <i>Phalloceros caudimaculatus</i>	411
5.2. Efeitos do aumento da temperatura sobre o metabolismo de rotina e excreção de amônia de <i>Phalloceros caudimaculatus</i>	45
5.3. Efeitos do aumento da temperatura sobre respostas ionorregulatórias de <i>Phalloceros caudimaculatus</i>	49
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS.....	66

1.INTRODUÇÃO

Existem hoje uma série de estudos sobre os limites superiores e inferiores de tolerância térmica em diferentes espécies de peixes, onde condições ambientais distintas atuam como fator determinante na determinação da vulnerabilidade das espécies às alterações no clima. Isso é válido também para a grande maioria dos microrganismos que habitam o mesmo ambiente aquático e fazem parte da cadeia alimentar (Zavala-Camin, 1996). Os organismos ectotérmicos aquáticos não apresentam a capacidade de regular fisiologicamente sua temperatura corporal, sendo essa controlada diretamente pela temperatura do meio ambiente externo (Schulte, 2015). A preferência térmica de diferentes espécies de organismos ectotérmicos pode ser influenciada pela idade, alimento disponível, época do ano, estresse, tamanho e história de vida dos animais (Angilletta Jr. & Sears, 2004; Barton & Iwana, 1991; Beitinger et al., 2000; Breau et al., 2011; Chung & Méndez, 1993; Heally & Schulte, 2012; Pérez et al., 2003; Pörtner, 2010; Reyes et al., 2011; Sloman et al., 2006). Além disso, as taxa de longevidade, taxa de excreção de compostos do metabolismo intermediário e o metabolismo basal, bem como parâmetros populacionais, como mortalidade, taxa de recrutamento, tamanho da população e sua distribuição pelos ambientes aquáticos, dependem de forma direta da temperatura da água (Brey, 1995; Kröncke et al., 1998; Perry et al., 2005; Pörtner et al., 2008; Shaw e Bercaw, 1962; Southward et al., 1995).

A temperatura é um dos mais importantes fatores abióticos que afetam sobrevivência e crescimento de organismos aquáticos (Lutterschmidt e Hutchison, 1997), e muitos teleósteos desenvolveram os seus próprios mecanismos adaptativos, tanto fisiológico quanto comportamentais, como estratégia para enfrentar às flutuações naturais na temperatura da água (Prosser e Heath 1991). A tolerância à temperatura nos peixes difere entre as diferentes espécies, temperatura de aclimação, bem como a duração da aclimação (Das et al., 2004; Diaz et al., 2007; Manush et al., 2004) e salinidade (Jian et al., 2003; Kumlu et al., 2010).

Estudos vêm demonstrando que organismos aquáticos costeiros podem ter menor capacidade de aclimação ao aumento de temperatura, quando comparados a outros organismos que vivem em regiões continentais, o que pode ser crucial para sua sobrevivência nesses ecossistemas (Vinagre et al., 2016). Em águas rasas das áreas litorâneas os organismos ectotérmicos enfrentam alterações térmicas rápidas e intensas devido a baixa profundidade do

ambiente (Lalli e Parson 1997). Essas alterações diferenciadas na intensidade e na velocidade de variação na temperatura da água ocorre devido à densidade e aquecimento da massa de água, influência direta da radiação solar, cobertura vegetal e sazonalidade do local (Lalli e Parson, 1997, Wetzel, 2001, Webb et al., 2008).

O aquecimento da superfície da terra vem sendo acelerado pelos impactos antropogênicos que tem contribuído para o aquecimento da superfície da terra, que podem ter consequências drásticas sobre os processos fisiológicos dos organismos ectotérmicos, alterando, por exemplo, o crescimento, a reprodução e sua distribuição pelos ambientes aquáticos (Pörtner, 2002b). Dessa forma, considerando cenários de alterações climáticas globais, o aumento da temperatura pode tornar os animais aquáticos vulneráveis ao estresse térmico. Assim, a vulnerabilidade ao aquecimento térmico entre as espécies em escala geográfica é uma questão importante na projeção dos possíveis impactos do aquecimento nos ecossistemas aquáticos. O aumento do aquecimento da superfície terrestre amplifica a exposição de pequenas ilhas, zonas costeiras baixas e deltas aos riscos relacionados à elevação do nível do mar para muitos sistemas humanos e ecológicos, incluindo secas, elevação do nível do mar, aumento da intrusão de água salgada, inundações e danos as regiões costeiras. (IPCC, 2018a, 2018b) Estudos realizados pelo IPCC (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas) sobre o efeito do aquecimento em regiões tropicais e temperadas, relatam que a temperatura da água tenderá a aumentar de 1 a 8°C nos próximos 200 anos (IPCC, 2007, 2013). Um grande problema de estresse hídrico e de facilidade de aquecimento ocorre em toda a região tropical, mas é menor nas áreas continentais da América do Sul, que ainda possui a maior cobertura florestal (Greenpeace, 2006). Assim, informações dos efeitos diretos da temperatura sobre o metabolismo das espécies ectotérmicas, e suas relações com os limites de tolerância térmica, são fundamentais para a compreensão de mudanças provocadas pelo aquecimento global. Embora as regiões tropicais possam aquecer a uma taxa lenta do que as latitudes temperadas, os alguns organismos ectotérmicos tropicais tendem a ser vulneráveis ao aumento da temperatura média da água (Vinagre et al., 2016).

A capacidade de um organismo para lidar com diferentes temperaturas é escrita por uma curva de desempenho térmico em forma de sino inclinada à esquerda, que aumenta junto com a temperatura a partir de um mínimo térmico crítico (CTMín), até uma temperatura ótima, e então cai rapidamente para atingir o máximo térmico crítico (CTMáx) (Pörtner et al., 2010; Schulte, 2015). A utilização da determinação da temperatura crítica máxima (CTMáx), e de informações sobre a tolerância e plástica térmica, proporcionam importantes informações sobre a ecologia e

distribuição dos peixes, sendo muito utilizada para identificar estratégias de sobrevivência às temperaturas críticas (Bennett e Beitinger,1997), prever a propagação de espécies exóticas (Bennett et al.,1997), quantificar as espécies ameaçadas (Walsh et al.,1998) e determinar as condições ótimas para piscicultura (Das et al.,2004).

Com os estudos dos limites térmicos as pesquisas fornecem informações fisiológicas fundamentais para mostrar os efeitos das mudanças climáticas globais em uma determinada região. Projeção de vulnerabilidade foram feitas para água doce (Comte & Olden, 2017a, 2017b), marinha (Comte & Olden, 2017a; Pinsky et al., 2019) e terrestre (Deutsch et al.,2008) e mostram que peixes que vivem em áreas próximas aos trópicos correm um risco maior ao aquecimento climático, mesmo que o aquecimento seja maior em altas latitudes (Deutsch et al.,2008). Por exemplo, Sunday et al. (2011) demonstraram que a tolerância térmica superior diminui de forma rápida em direção aos polos, mas a amplitude da tolerância térmica, ou seja, a diferença entre os limites térmicos superior e inferior, aumenta em direção às altas latitudes. Portanto, a tolerância superior parece ser compensada pelas variações latitudinais na temperatura experimentadas pelas espécies em suas faixas. Como resultado, a margem de segurança térmica (TSM; a diferença entre o limite térmico e a temperatura máxima do habitat) tende a ser mais baixa para espécies que vivem em regiões quentes próximas aos trópicos (Comte & Olden, 2017a; Dahlke et al., 2020; Giomi et al., 2014). Todos esses dados sugerem que as espécies que vivem em habitats térmicos com altas temperaturas e estáveis apresentam tolerância térmica fisiológica limitada, e uma curva de desempenho térmica estreita.

Segundo dados de tolerância térmica, o risco de extinção atual é muito alto em áreas tropicais em comparação com áreas temperadas, e as espécies tropicais da América do Sul parecem ser as mais ameaçadas pelas mudanças no clima (Urban, 2015). No entanto, a chance de sobreviver e diminuir as consequências das mudanças no clima irá depender de dois fatores os limites superiores de tolerância das populações, e da sua plasticidade fenotípica por meio da capacidade de aclimação (Bozinovic et al.,2011; Seebacher et al.,2015). A capacidade de aclimação é uma resposta fundamental relacionada a plasticidade fenotípica para compensar os desafios ambientais, que pode ser utilizada para prever se as espécies vão conseguir modificar suas respostas fisiológicas e diminuir os riscos de extinção (Gunderson & Stillman, 2015). No entanto, a tolerância térmica superior e a plasticidade também podem evoluir em paralelo, refletindo uma troca evolutiva entre essas duas características devido a pressões seletivas (Bozinovic et al., 2011; Stillman, 2003). Assim, espécies de peixes tropicais com altos limites

térmicos podem estar em maior risco de aquecimento, não apenas porque já estão vivendo perto de seus limites de tolerância térmica, mas porque exibem plasticidade fenotípica reduzida (Sgrò et al.,2016).

A técnica de temperatura letal incipiente (ILT; Fry et al., 1942), em que grupos de peixes são expostos em uma série de temperaturas altas e baixas, é utilizada para determinar temperaturas letais a 50% da população (Fry, 1967 para uma descrição completa). Polígonos derivados de dados ILT são bastante onerosos, exigindo grande número de peixes e equipamento. Desde o início da década de 1950 a ILT não têm sido mais amplamente utilizadas, tendo sido substituída pela metodologia que determina a temperatura crítica máxima (CTM_{áx}) para determinar a tolerância térmica dos organismos (Lutterschmidt e Hutchinson,1997; Beitinger et al., 2000). Os testes de capacidade térmica crítica requerem, relativamente, poucos animais, equipamentos de pouca complexidade e a avaliação da tolerância térmica não é letal (Fry,1967; Beitinger et al.,2000). Ela é um parâmetro empregado em estudos macrofisiológicos e visa compreender melhor, e comparar as variações de parâmetros fisiológicos dos organismos ao longo de gradientes geográficos onde existem marcadas alterações na temperatura do ambiente aquático (Cowles & Bogert 1944, Lutterschmidt e Hutchison 1997, Carveth et al., 2006, Rezende et al., 2014, Vinagre et al., 2015).

A capacidade de suportar grandes variações térmicas entre as espécies de peixes tem uma forte influência filogenética, o que pode indicar um problema sério à evolução das espécies tropicais. Ou seja, além de viver mais perto aos seus limites térmicos, as espécies tropicais podem ter muito mais sensibilidade e menor adaptabilidade a mudança no clima. Os processos fisiológicos auxiliam na determinação dos limites de tolerância a fatores abióticos como a temperatura, e contribuem para o entendimento dos impactos gerados por alterações na temperatura do ambiente (Pörtner, 2002, Tomanek, 2008, Tomanek, 2010). Porém, há um limite térmico a partir do qual as reações bioquímicas, como o funcionamento de enzimas e ativação de proteínas, diminuem drasticamente, onde os efeitos da temperatura podem ser letais para o organismo (Pörtner 2002, Willmer et al., 2005, Somero 2011, (Madeira et al., 2012).

Nesse contexto, a extensão do impacto do aumento da temperatura é variável e depende da janela de tolerância térmica das espécies. As mudanças climáticas devem favorecer organismos com amplas faixas térmicas (euritérmicos) e que, conseqüentemente, são capazes de tolerar maiores variações na temperatura (Stillman e Somero 2000; Calosi et al., 2008;

Tewksbury et al., 2008; Schulte, 2015). Ela é descrita como uma faixa favorável de temperatura ou amplitude de desempenho para cada espécie. Inclui uma zona ótima e uma zona sub ótima, em que acima ou abaixo dessa faixa o desempenho é afetado negativamente e a sobrevivência da espécie é comprometida, a menos que seja por um curto período. Além disso, os ectotérmicos são capazes apenas de realizar regulação térmica comportamental (Neill e Magnuson, 1974; Neill et al., 1972; Rozin e Mayer, 1961), que pode implicar na seleção de novos ambientes com base nas características termais do habitat.

Os peixes captam o oxigênio dissolvido na água por meio de trocas gasosas ocorridas no epitélio branquial, onde há intensa aproximação entre o sangue e a água (Wedemeyer, 1996). O aumento da temperatura em ambientes aquáticos reduz a concentração de oxigênio dissolvido disponível, o que pode acarretar situações de hipóxia. Nessas condições, ocorre perda de desempenho do indivíduo ocasionado primariamente pelo estresse bioquímico. O metabolismo é reduzido e a demanda metabólica por oxigênio se mantém em níveis basais por meio da redução da atividade aeróbica, levando a um maior recaimento sobre o metabolismo anaeróbico (Pörtner et al., 2004; Pörtner & Lanning, 2009; Schulte, 2015).

Assim, a capacidade dos peixes em manter seu desempenho ótimo em um ambiente termicamente mais quente e estressante estaria associado com a habilidade em manter a produção de energia para suprir as demandas metabólicas. Nesse contexto, a teoria da tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio (Oxygen and Capacity-Limited Thermal Tolerance, OCLTT) indica que em altas temperaturas, ou próximos das temperaturas críticas da espécie, a taxa metabólica basal de um organismo é aumentada e seu escopo aeróbico é reduzido (Revisto por Schulte, 2015). O metabolismo basal também depende da temperatura de aclimação, do tempo de aclimação dos indivíduos e das espécies (Das et al., 2004). As taxas metabólicas são medidas indiretamente através das taxas de consumo de oxigênio (Brett, 1964, 1979; Kutty, 1968, 1981). As temperaturas ideais para os peixes podem ser estimadas indiretamente com base na relação entre o consumo de oxigênio e a aclimação e temperatura (Kita et al., 1996). Além disso, a capacidade de aclimação térmica do metabolismo, ou coeficiente de temperatura (Q_{10}), é um parâmetro calculado a partir da taxa metabólica dos animais em diferentes regimes térmico e é utilizado nos estudos de tolerância térmica para avaliação da sensibilidade das espécies em função do aumento da temperatura. Espécies em fase de crescimento são capazes de se aclimatar e deslocar a janela térmica por meio de mudanças nas densidades mitocondriais e outras adaptações nas capacidades funcionais de seus sistemas fisiológicos (Pörtner, 2001, 2002, 2006).

As espécies podem assim apresentar diferentes respostas a esse agente estressores, o que tem levado muitos trabalhos a investigar os efeitos da exposição de peixes a este metabólito (Val & Almeida-Val, 2000).

Outro fator que pode influenciar no metabolismo e tolerância térmica das espécies de peixes é a salinidade, uma vez que, ela é considerada um dos fatores ambientais com grande importância na biologia das espécies, assim como a temperatura (Kir & Sunar, 2018; Kir et al., 2019). Os níveis de salinidade ideais podem variar de acordo com a espécie e estágio de vida, e precisam ser levados em conta em cada caso particular. As concentrações de sais na água interferem no gasto de energia o metabolismo de peixes eurialinos, relacionado ao controle da quantidade de água e sais no organismo, processo conhecido como osmorregulação (Boeuf; Payan, 2001; Chabot; Guénette, 2013).

A salinidade é composta pela concentração de íons dissolvidos na água (Tucker, 1998). Muitas espécies de teleósteos que habitam as regiões costeiras são reconhecidamente eurialinas, e podem facilmente ajustar o funcionamento de seus sistemas fisiológicos às condições de salinidade dos ambientes marinho, estuarino e de água doce. Essas adaptações fisiológicas, particularmente de sua capacidade osmo e ionoregulatória, ocorrem em dois momentos distintos e são dependentes do tempo em que o animal permanece em cada ambiente. A primeira fase é conhecida como “período adaptativo” onde a osmolaridade dos fluidos corpóreos do animal (e.g. plasma) é alterada em função da salinidade do meio; ou seja, quando o animal se move para um ambiente mais diluído (e.g. estuários e água doce) a osmolaridade do plasma é reduzida devido à perda de sais por difusão e ganho de água por osmose. Por outro lado, quando o animal se move para o ambiente marinho ocorre o inverso, aumento da osmolaridade plasmática em decorrência do ganho de sais e perda de água. Na segunda fase, chamada de “período regulatório”, a osmolaridade e concentração de sais dissolvidos no plasma tendem a ser ativamente reguladas para que estas sejam mantidas dentro dos limites fisiológicos da homeostase (Prodocimo & Freire, 2006). Durante a exposição a variações naturais na salinidade do ambiente, as espécies eurialinas exibem profundas alterações no padrão morfofuncional de seus epitélios transportadores, tais como as brânquias e rins, particularmente durante a movimentação entre condições totalmente marinhas até ambientes salobros ou de água doce, ou vice-versa (Bystriansky & Schulte, 2011; Evans et al., 2005)

Portanto, a aclimação à mudança de salinidade requer uma reorganização estrutural e metabólica para satisfazer o aumento da demanda energética associada à exposição ao novo

ambiente. Assim, a salinidade da água interfere no gasto de energia provocando alterações no consumo de oxigênio e no seu metabolismo, isso acontece em peixes de água doce e também de peixes marinhos, relacionado ao controle da quantidade de água e sais do seu corpo (Boeuf; Payan, 2001; Chabot; Guénette, 2013). Além disso, o aumento da temperatura da água pode desestabilizar as junções paracelulares nas brânquias dos peixes aumentando a sua permeabilidade a íons, que pode resultar em severos desequilíbrios iônicos e plasmáticos (Baldisserotto & Val, 2002).

Phalloceros caudimaculatus - etimologia: *Phalloceros*, do grego *phallos*, que significa ‘pênis’, e *kéras* que significa ‘chifre’. *caudimaculatus*, do latim *caudi*, que significa ‘cauda’, e *maculatus*, que significa ‘manchado’ – são peixes popularmente conhecidos como Barrigudinho ou “Guarú”, um termo em tupi-guarani que tem por significado “peixe que come de tudo”. São peixes actinoptérgeos pertencentes à ordem Cyprinodontiformes, da família Poeciliidae, (Mega & Bemvenuti, 2006). Vivem geralmente micro-habitats marginais (Meffe & Snelson, 1989) e tendem a suportar marcadas alterações na salinidade e temperatura da água. Os *Phalloceros caudimaculatus* estão presentes nas latitudes tropicais e subtropicais do novo mundo, concentrando-se nas Américas Central e do Sul, ocorrendo em ambientes de água doce e salobra (Nelson, 1984). Esta espécie ocorre na região neotropical da Argentina, Uruguai, Paraguai e no Sul e Sudeste do Brasil, sendo encontrado até o Espírito Santo e Bahia (Wolff et al., 2007). Maltchik et al., (2010) associaram essa espécie a áreas úmidas áreas com baixo fluxo de água, com maior diversidade de habitat e matéria orgânica e menor concentração de fósforo. A espécie vive em uma faixa de temperatura média de 20° a 28°C em outras regiões, em específico na região tropical; 20°C – 24°C (Fishbase), em seu ambiente natural. De acordo com Akanksha et al., (2010), é um organismo de testes adequado de acordo com suas características, pois seu grupo é ecologicamente representativo, ovovivíparo com ciclo reprodutivo curto, de fácil disponibilidade, cosmopolita e uma espécie nativa do Brasil (Wolff et al., 2007). Portanto, as informações obtidas com esse estudo tem como proposito contribuir e ser utilizada como referências para novos trabalhos sobre a ecofisiologia térmica da espécie *Phalloceros caudimaculatus*, bem como uma possível base para explicar a futuras distribuições, e/ou mudanças no padrão de distribuição das espécies nas regiões costeiras relacionadas a alterações no regime térmico em regiões estuarinas Neotropicais. Este estudo também tem a intenção de ajudar a conservação da espécie frente às mudanças no clima.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a influência da aclimação a diferentes temperaturas sobre a tolerância térmica, e respostas do metabolismo energético, excreção de compostos nitrogenados e ionoregulação da espécie *Phalloceros caudimaculatus*, contribuindo para caracterizar e quantificar a suscetibilidade de espécies de peixes estuarinos neotropicais frente às alterações climáticas globais.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a temperatura crítica máxima (CTMáx) de exemplares da espécie *Phalloceros caudimaculatus* aclimatados a três diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) e em duas salinidades 6 e 11‰;
 - Determinar a taxa de excreção da amônia nos exemplares da espécie *Phalloceros caudimaculatus* aclimatados a três diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) em salinidade 6‰;
 - Avaliar as respostas do metabolismo de rotina (consumo de oxigênio), em indivíduos da espécie *Phalloceros caudimaculatus* aclimatados a três diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) em salinidade 6‰;
 - Verificar a influência da aclimação em três diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) o do fluxo iônico líquido de cloreto (Cl⁻) e sódio (Na⁺) na espécie *Phalloceros caudimaculatus* na salinidade 6‰.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais e caracterização do ponto de coleta

Os exemplares de *Phalloceros caudimaculatus* ($0,670 \pm 0,119$ g - Média \pm EP) (Fig.1) foram coletados na zona Litoral, especificamente em poças de maré, de 40 cm a 1,5 m de profundidade, com o auxílio de rede de arrasto de praia tipo picaré, com 5 m de largura e 1 m de altura, malha de 2,5 mm nas asas e 2,5 mm no saco da rede. A rede foi utilizada em profundidades menores que 1,5 m, em diferentes habitats (Vieira et al., 2006), e puçá de malha de 2,5 mm. A coleta foi realizada em Ilha Comprida -litoral Sul – SP ($25^{\circ}00'00.6''S$ $47^{\circ}86'52.1''W$) (Fig. 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5). Os peixes obtidos na coleta foram transportados em sacos de plástico contendo 3 partes de água salobra do próprio local de coleta e 2 partes de carga de oxigênio puro, sendo então acondicionados em caixas plásticas para o transporte até o Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia Aquática (LECTA), do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista (UNESP_IB/CLP) em São Vicente, São Paulo (cerca de 253 km, aproximadamente de 4 a 5 horas).

No local de coleta foram feitas também medidas de parâmetros físicos e químicos da água, por meio do Medidor Multiparâmetro (pH/Cond/OD/Temp) – AK88 e com o auxílio do Medidor de salinidade (Instant ocean Hydrometer) (temperatura $26,15^{\circ}C$, pH 7,61 e salinidade 10-11‰), enquanto amostras de água foram retiradas e armazenadas em frascos de âmbar e Falcons 50 ml, e mantidas a $-2^{\circ}C$, para posterior determinação da concentração dos principais íons dissolvidos. (Anexo I). Todos os procedimentos experimentais e de coleta foram previamente submetidos para a apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB/CLP (Protocolo 06/2019).



Figura 1. Exemplar de *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868).

Foto: Roberta Callicó Fortunato



Figura 2.1. – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Ilha Comprida (SP) identificando o local onde fica a balsa do município de Cananeia. SP-Brasil.

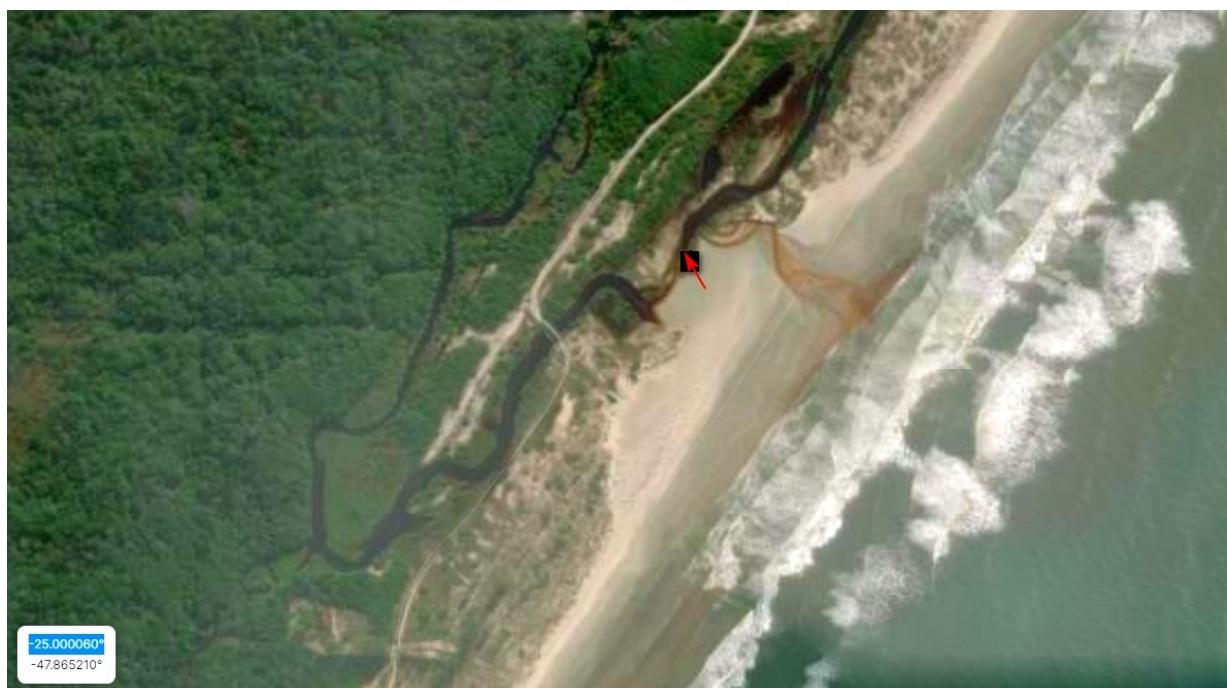


Figura 2.2. – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Ilha Comprida (SP).

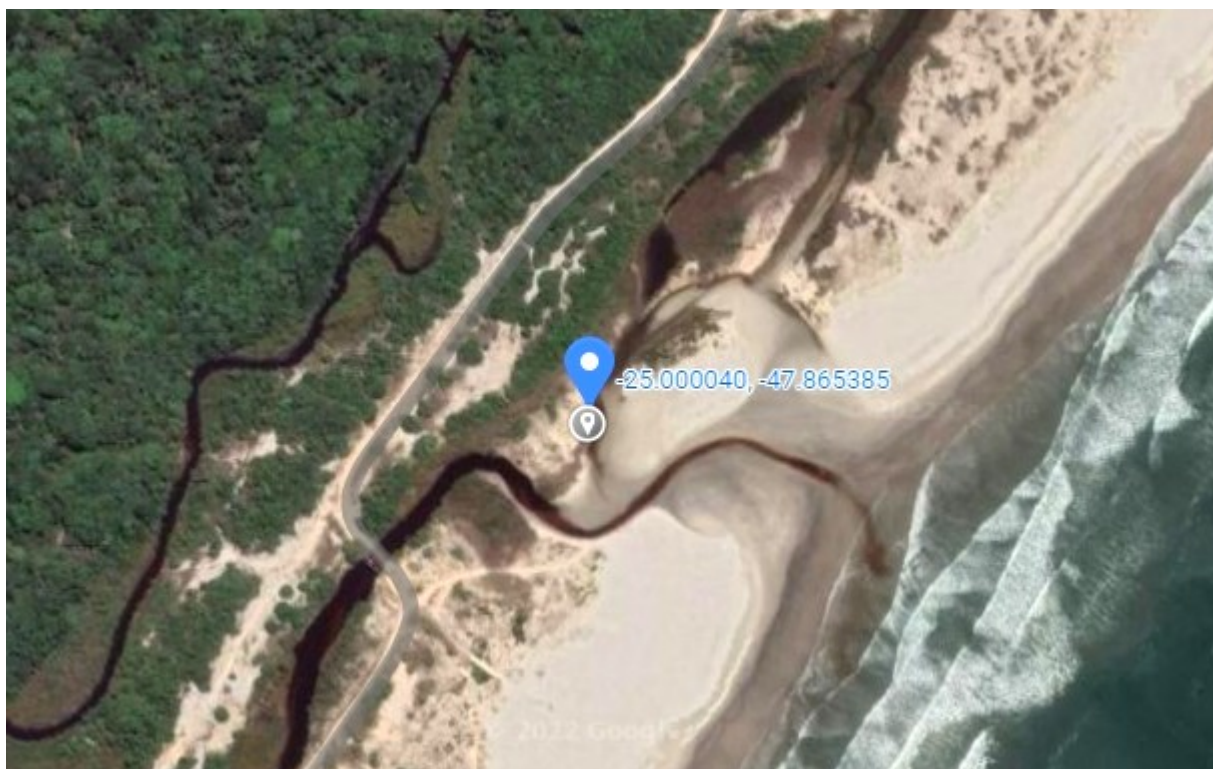


Figura 2.3. – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Ilha Comprida (SP) vista aproximada do ponto de coleta.



Figura 2.4. – Mapa da área de coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Praia de Fora, Ilha Comprida – litoral Sul – SP – Brasil ($25^{\circ}00'00.6''S$ $47^{\circ}86'52.1''W$). Cerca de 4 h 3 min, (253 km) via BR-101 e BR-116 de distância do Instituto de Biociências – Câmpus do Litoral Paulista – Unesp – São Vicente. (A) A face sudeste, voltada para praia, é formada por área plana. (B) A face leste e oeste, faixa de areia e vegetação. (C) Amostragens de *P. caudimaculatus* em poças de maré. (D) A face nordeste, o continente, com moradias.

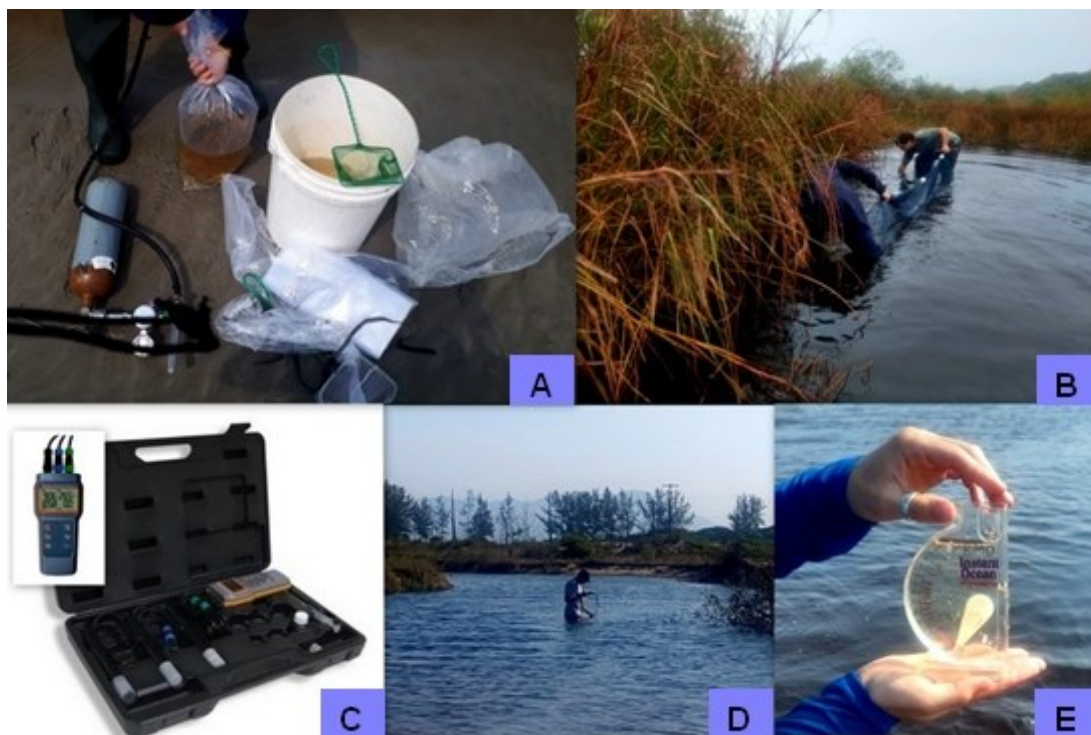


Figura 2.5. – Ponto coleta dos exemplares de *P. caudimaculatus* em Praia de Fora, Ilha Comprida. (A) Acondicionamento dos animais em sacos com oxigênio para o transporte ao Câmpus do Litoral Paulista (B) Atividade de coleta com rede, cercando os peixes no capim onde esses animais ficam refugiados e protegidos. (C) Equipamento Multiparâmetro (pH/Cond./OD/Temp.) - AK88 (D) Verificação dos parâmetros pH, oxigênio dissolvido, condutividade do ambiente nas poças de maré. **Fonte:** Manual do equipamento. https://www.akso.com.br/produto/ph-do-solo/multiparametro_ph_cond_od_temp_ak88-238 (E) Verificação da salinidade com Medidor de (Instant ocean Hydrometer).

3.2 Aclimação

No laboratório, os animais foram transferidos para tanques de polipropileno de aproximadamente 180 L por 1 a 3 dias com água do próprio local, para diminuir o estresse da coleta (Ruane et al., 2001). Posteriormente, foram mantidos em aquários de 23 L e 40 L contendo quinze a vinte peixes selecionados aleatoriamente (N=15-20 em cada tratamento) com filtração biológica (filtros Fe 50 Aquatech / 6,7 L/min), com água do mar obtida no local da coleta e posteriormente, substituída gradualmente por água do mar reconstituída com sal marinho (Sal Blue Treasure Reef 20 Kg), sendo a água trocada diariamente (30% a 50%) para assegurar a boa qualidade nos aquários.

Os parâmetros da água, previamente ao período de aclimação, foram mantidos de acordo com os do ambiente natural (Anexo I), mantendo-se: salinidade de 6‰ e 11‰; temperatura variando 24°C a 26°C e pH 7,0 e 7,61, com sistema de recirculação de água, aeração e recirculação constante, fotoperíodo 12:12 (luz:escuro), em um período de 10 dias

para o início da aclimação aos três diferentes regimes térmicos selecionado para o estudo, a saber: 20°C, 25°C e 30°C. Durante esse período de aclimação, os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial extrusada e peletizada para superfície (proteína bruta) (mín.) 350g/kg (Nutricon). A retirada dos restos de ração e fezes dos peixes foi feita diariamente por meio de sifonamento. Após a alimentação, cerca de 30% a 50% do volume de água foi diariamente renovado para reduzir a quantidade de amônia tóxica nos aquários. A reposição de água sempre foi feita com água previamente aquecida com a mesma temperatura de cada aquário (com variação máxima de 1,5°C). Posteriormente, foi feito o aumento ou a diminuição da temperatura dos aquários seguindo a taxa de 1°C por dia (1,0°C ± 0,3). Os animais foram então selecionados por tamanho e aclimatados por uma semana em três regimes térmicos diferentes (20, 25 e 30°C) (Anexo V), monitorados pelo termostato digital Tic-17rgti (Full Gauge) e Stc-3008 Termostato e Controlador de temperatura duplo, ligados a termostatos eletrônicos serie AT 150 Watts (Atman) para cada aquário, ajustado como os parâmetros do termostato digital (TM-946, Type k / J, Pt 100 ohm, Lutron®) e termômetro de mercúrio (marca Incoterm, de precisão 0,1°C). O pH foi mantido entre 7- 7,6 (Anexo II) e monitorado utilizando um pHmetro de bancada (ATC. PH0-14). As temperaturas selecionadas para o estudo representam a temperatura encontrada no ambiente natural no inverno (e.g. 20-21 °C), temperatura baseada no aumento esperado para 2100 em águas superficiais (i.e. 24-25 °C) (IPCC, 2013, 2018), e a temperatura representando um cenário climático extremo (i.e. 29-30 °C). A temperatura da sala foi controlada e mantida a 22°C e a temperatura da água dos aquários foi monitorada a cada 6h sendo mantida a temperatura com o auxílio do termostato digital. O pH e as temperaturas foram verificadas todos os dias com diferentes equipamentos para garantir valores precisos nesse período de aclimação, aos animais foi garantida mínima perturbação.

3.3. Determinação dos limites de tolerância térmica máxima (CTM_{max})

Na primeira série experimental foi realizada a determinação do efeito da temperatura de aclimação sobre a temperatura crítica máxima (CTM_{max}) em indivíduos de *P. caudimaculatus* aclimatados em duas salinidades distintas (6 e 11‰), seguindo a metodologia descrita por Beitinger e colaboradores (2000). A CTM_{max} é definida como a média aritmética dos pontos térmicos nos quais foi atingido o *end point* (Beitinger et al., 2000). Para tanto, o *end-point* selecionado foi a perda do equilíbrio natatório (*loss of equilibrium* – LOE), que foi assumido como a perda dos movimentos locomotores e quando

o animal permanece em posição horizontal. Os critérios para a determinação do ponto final foi o mesmo seguido por diferentes autores (Mora e Ospina, 2001; Madeira et al., 2012; Vinagre et al., 2015, 2018) (Fig. 3). Os peixes foram então expostos a um aumento constante de 0,3°C/min (Beitinger et al., 2000; Das et al., (2004, 2005); Dalvi, et al., 2009). Todos os peixes foram resgatados e recuperados após o experimento, colocados em temperatura ambiente a partir da temperatura final do experimento. A técnica foi utilizada em inúmeros trabalhos (Hutchinson, 1976), e está bem estabelecida como uma ferramenta poderosa para estudar a fisiologia do estresse térmico em peixes (Beitinger & McCauley, 1990).

Anteriormente ao início do experimento, os exemplares de *Phalloceros caudimaculatus* foram mantidos por 24 h nos aquários sem alimentação, ou qualquer perturbação, e após esse período, foram transferidos para os erlenmeyer onde foram mantidos por (30 min) com aeração e recirculação constante para reduzir o estresse de manipulação. Respeitando a biomassa de 0,5 gramas por litro, os animais então foram transferidos para erlenmeyer de 1 L ou 2 L, também com aeração e recirculação contínua. Os estoques de água a ser utilizada no experimento foi preparada uma hora antes dos experimentos, com os seguintes parâmetros: água do mar reconstituída (Sal Blue Treasure Reef) nas salinidades de 6 e 11‰ e pré aquecida para cada temperatura desejada (20, 25 e 30°C) e pH 7,0, água do mar reconstituída com a salinidade (11‰). (ANEXO – II). Para o início do teste os exemplares de *P. caudimaculatus* foram adicionados ao erlenmeyer (1 L ou 2 L) acondicionado no interior do aparelho de Banho Ultratermostático Microp. com circ. - Q214M (Quimis), programado para o aumento gradual de 0,3°C/min. (Fig. 4). A temperatura foi monitorada e controlada com termostato digital Tic-17rgti (Full Gauge) com sua sonda colocada no interior do Erlenmeyer (Fig. 5). No experimento com salinidade 11‰ o número amostral de animais foi de N=8, N=9 e N=8 nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, respectivamente, enquanto no ensaio com salinidade 6‰ foi utilizado um N = 9 para todas as temperaturas de aclimação.

A temperatura em que cada animal atingiu o *end-point* (perda do equilíbrio) foi medida, e então a média aritmética e o desvio padrão da temperatura crítica máxima (CTMáx) foi calculada para cada regime térmico testado. A capacidade de aclimação térmica da espécie em cada temperatura de aclimação foi calculada pela diferença entre a temperatura de aclimação 20, 25 e 30°C e o valor de CTMáx determinado para indivíduo. Todos os animais que atingiram o *end-point* foram pesados em balança semi analítica digital (Mettler Toledo, AL204), anestesiados e eutanasiados em uma solução (0,2%) de tricáina

metanosulfonato (MS-222) e, posteriormente, depositados na coleção do LECTA.

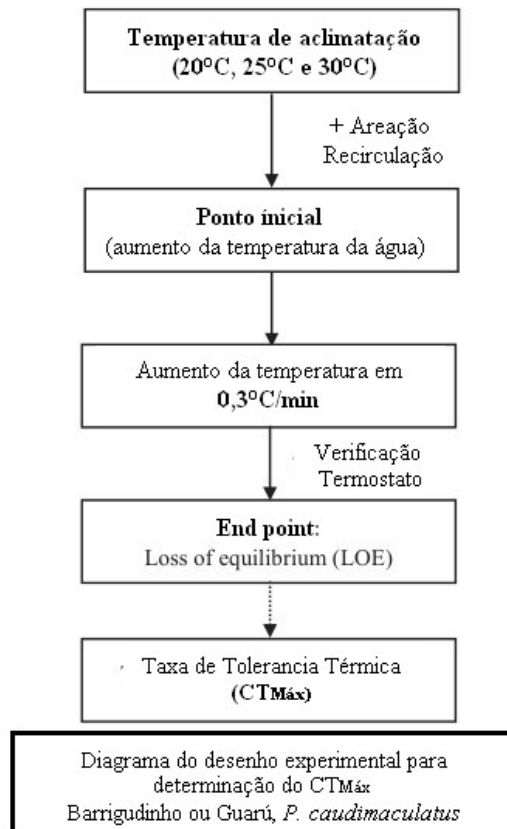


Figura 3. – Diagrama demonstrando os passos do ensaio para a determinação da temperatura crítica (CTMáx).



Figura 4. (A) Equipamento de banho Ultratermostático Microp. com circ. - Q214M (Quimis) . (B) Verificação de temperatura e pH, (PHMETRO de bancada com ATC. PH0-14). (C) Controlador de temperatura Stc-3008 Termostato e Controlador de temperatura duplo, ligados a termostatos eletrônicos 50 Watts e equipamentos de aeração e recirculação (Compressor De Ar Maxxi Power Pro-9000). (D) Peixes *P. caudimaculatus* colocado para

reduzir período de estresse (30 min). (E) e (F) *P. caudimaculatus* em situação de estresse térmico na (CTM_{áx}) próximo a perda do equilíbrio natatório end point (loss of equilibrium – LOE) (Beitinger et al., 2000).

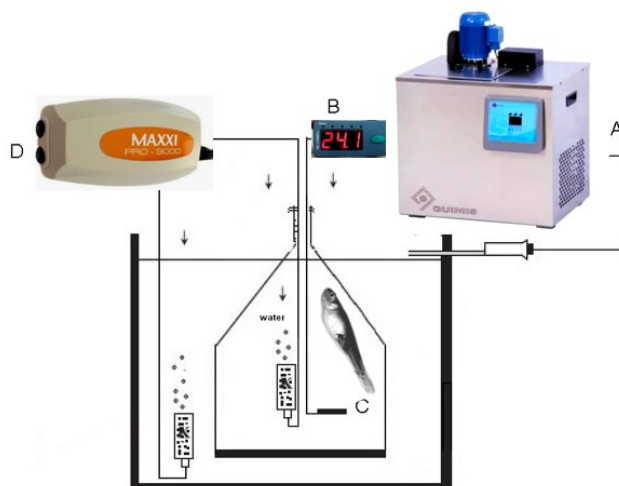


Figura 5. (A) Banho ultratermostático microp. com circ. - Q214M (Quimis) (B) termostato TIC-17RGTi - Full Gauge Controls (Full Gauge) (C) *Phallocerros caudimaculatus* (D) Compressor De Ar Maxxi Power Pro-9000 3w A 6w 220v Spid Fish.

3.4. Determinação do consumo de oxigênio e respostas ionoregulatórias

A determinação simultânea da taxa de consumo de oxigênio (VO_2), taxa de excreção de amônia (J_{Amm}) e fluxos líquidos de Na^+ e Cl^- (J_{net}^{Na} e J_{net}^{Cl}) dos exemplares de *P. caudimaculatus* ocorreu após o período de aclimação dos peixes em cada um dos três regimes térmicos selecionados (20, 25 e 30°C) (N=10 por tratamento) (Figs 6 e 7). Para esses ensaios os animais (N=10) foram mantidos em água do mar reconstituída em salinidade 6‰. Para tanto, os indivíduos aclimatados por 7 dias foram acondicionados individualmente em câmaras de plástico com capacidade de 200ml, e mantidos por 2h dentro de cada câmara com aeração constante e sem qualquer perturbação, sendo realizada trocas de água de 50% a cada 1h. Os 10 animais foram colocados em uma bandeja plástica e mantidos em banho maria para o controle da temperatura ao longo do teste. A temperatura foi controlada com o aparelho termostato (Full Gauge) e aquecedor (Atman) e monitorados nas respectivas temperaturas de aclimação para o controle e a manutenção da temperatura em todas câmaras e em todo período do experimento. Todos os quatro lados da caixa eram de cor escura e as câmaras recobertas com plástico preto para minimizar os distúrbios visuais dos animais.

Após o período de 2h foi realizada a medida inicial da concentração de oxigênio na água de cada câmara com um oxímetro digital (Dissolved Oxygen Meter; YSI 5100), de sensibilidade, $\pm 0.1\%$ (4 dígito), caracterizando o início da verificação do consumo de O_2 . (Figura 6 e 7). Após

esses procedimentos, foram retiradas amostras de água (15 ml) para a posterior determinação dos níveis de Na^+ e Cl^- , e a coleta de 2 ml de água (eppendorf) para a determinação da concentração de amônia. O material coletado foi mantido sem contato com iluminação e congelado a -20°C . Após a retirada das amostras as câmaras foram imediatamente vedadas com rolhas de laboratório para vedar balão de Erlenmeyer (1,5 cm de espessura) envolvidas com Parafilm® para garantir o total isolamento, mantida sem oxigenação por 2h.

Depois do período de 2 horas sem oxigênio, os frascos foram reabertos e uma nova medida da concentração de O_2 na água foi realizada, e nova amostras de água foram retiradas. (Ao final dos ensaios todos os animais foram pesados com a balança semi analítica digital (Mettler Toledo, AL204) e conservados em refrigeração a -20°C . Os animais foram então depositados na coleção do LECTA. Os estoques foram preparados uma hora antes de sua utilização, com água do mar reconstituída com salinidade (6‰), aeração constante, (pH 7,0) e temperatura específica para cada temperatura de aclimação (20, 25 e 30°C).

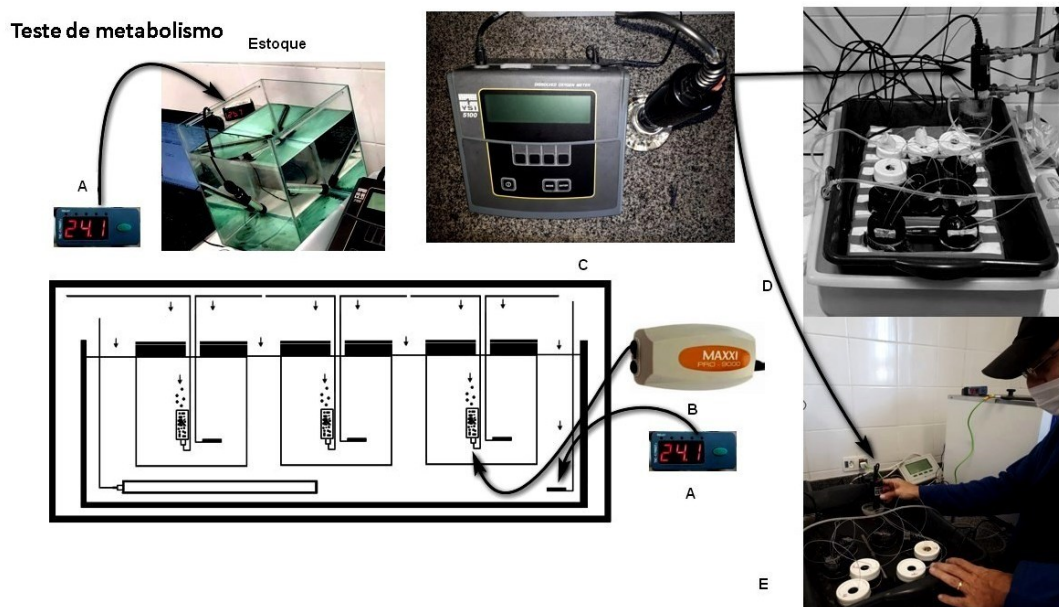


Figura 6. Experimento de Consumo de Oxigênio, (A) termostatos TIC-17RGTi - Full Gauge Controls (Full Gauge) o () (B) Compressor De Ar Maxxi Power Pro-9000 3w A 6w 220v Spid Fish (C) Oxímetro (A) bandeja com recipiente de 200ml (D) realizando a verificação do oxigênio.

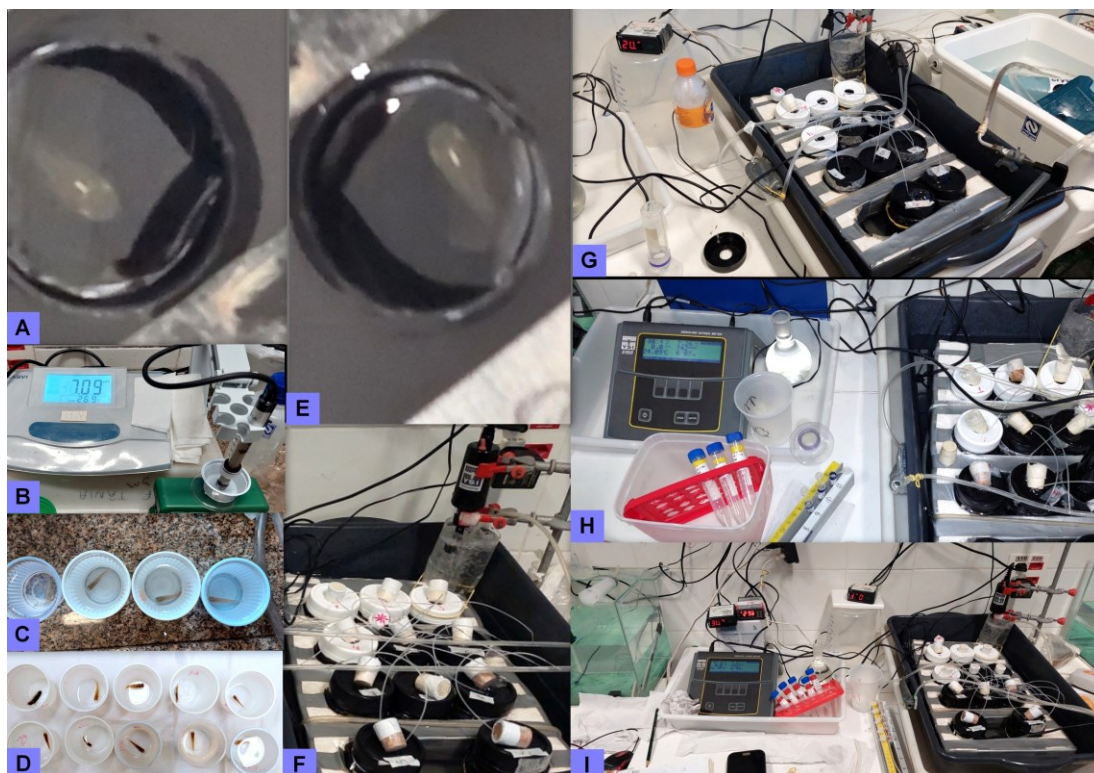


Figura 7.– (A) *P. caudimaculatus* período para reduzir estresse (120 min). (B) Equipamento para verificar pH e temperatura no início e fim do experimento. (C) *P. caudimaculatus* após os experimentos. (D) *P. caudimaculatus* no fim do experimento após 8h, verificação do peso. (E) Animal no final do experimento. (F) Equipamentos: câmara de plástico com (200ml), areação e recirculação feita com cateter de polietileno, período de trocas parciais de água para o início do experimento. (G) Experimento 20°C com refrigeração. (H) Experimento 25°C (I) Experimento 30°C estoque e controladores de temperatura para garantir precisão.

3.5. Técnicas Analíticas e Cálculos

A concentração total de sódio (Na^+) das amostras de água dos experimentos foi determinada por meio de fotometria de chama (Analyzer 910), enquanto a concentração de Cl^- foi determinada por meio do ensaio colorimétrico descrito por Zall e colaboradores (1956). A concentração de Cl^- foi obtida por meio de ensaio colorimétrico utilizando os reagentes tiocianato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{SCN})_2$), nitrato férrico $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a 20,2% e água deionizada para formular solução de uso a 1:1:13 respectivamente. As amostras de água foram diluídas a 1:1000 em água deionizada e inseridos 150 μL de amostra diluída somado a 150 μL de solução de uso dispostas em triplicata nas microplacas para leitura em espectrofotômetro a 480nm, e posterior comparação à curva padrão obtida através da diluição de padrões de NaCl . A concentração de amônia nas amostras de água coletadas foi determinada pelo método do indofenol, conforme descrito por Verdouw e colaboradores (1978). A concentração de amônia na água foi determinada através do uso de 30 μL das soluções de salicilato de sódio a 40% (dissolução de 4g de $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$ em 10ml de água

deionizada), nitroprussiato de sódio (dissolução de 0,02g de $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100ml de água deionizada) e hipoclorito a 6% (2:1 em citrato de sódio) somado a 120 μL de amostra por poço, dispostas em triplicata nas microplacas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 650nm e comparada à curva padrão de NH_4Cl .

A partir dos dados das concentrações de oxigênio, amônia, Na^+ e Cl^- na água foram calculados a taxa de consumo de oxigênio (VO_2), a taxa de excreção de amônia ($J_{\text{Amm_N}}$), e os fluxos líquidos de Cl^- ($J_{\text{Net}}^{\text{Cl}}$) e o fluxo de sódio ($J_{\text{Net}}^{\text{Na}}$) dos animais em cada condição experimental, utilizando as variações na concentração dos analitos dissolvido na água (mgO_2/L ou $\mu\text{mol}/\text{L}$) ao longo do intervalo de exposição, relativizadas pelo peso dos animais (g), o volume das câmaras (L) e o tempo do intervalo de exposição (h). Para tanto, foi utilizada a seguinte equação descrita por Wood (1992):

$$\text{MO}_2 = [(X1 - X2) * V] / (P * T)$$

Onde, X1 e X2 são os valores iniciais e finais dos analitos (i.e oxigênio, amônia, Na^+ e Cl^-), em cada intervalo experimental, V e o volume (L) da câmara, P o peso (g) do animal e T o tempo (h) do intervalo de exposição. A partir dos valores calculados de consumo de oxigênio foi calculado o coeficiente de temperatura (Q_{10}) que representa o grau de dependência do metabolismo em função do aumento em 10°C na temperatura da água. O cálculo foi feito a partir da equação abaixo em relação as taxas de consumo de oxigênio obtidas dos animais aclimatados em 20°C e 30°C :

$$Q_{10} = (\text{MO}_2^{\text{final}} / \text{MO}_2^{\text{inicial}})^{10(T_2 - T_1)}$$

3.6. Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Diferenças entre a temperatura crítica máxima (CTMáx) e a capacidade de aclimação térmica nas duas salinidades (6‰ e 11‰) e três temperaturas de aclimação testadas, foram avaliadas por meio de uma análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way). Já as respostas nas taxas de consumo de oxigênio (VO_2), taxas de excreção de amônia ($J_{\text{Amm_N}}$), fluxos líquidos de Cl^- ($J_{\text{Net}}^{\text{Cl}}$) e o fluxos líquidos de Na^+ ($J_{\text{Net}}^{\text{Na}}$) dos exemplares de *P. caudimaculatus* aclimatados a cada uma das três temperaturas na salinidade de 6‰ foram determinadas por meio de uma Análise de Variância de um fator (ANOVA one-way), sendo o regime térmico

de aclimação (20°C x 25°C x 30°C) considerado fator na ANOVA. As diferenças entre as médias foram determinadas por meio de teste a posteriori de Tukey. Diferenças estatísticas significativas foram aceitas no nível de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do software Sigma Stat (v.3.5), R 4.0.3.4 e Jamovi 2.2.5, e os gráficos foram construídos com o software Sigma Plot (v.12.0). A normalidade a homogeneidade de variância foi verificada antes do teste. Na CTMáx, as temperaturas foram comparadas entre si usando teste de ANOVA unidirecional, e diferenças entre grupos são testadas por Tukey *post hoc*.

4. RESULTADOS

Os peixes *Phalloceros caudimaculatus*, conhecidos popularmente como guarú ou barrigudinho, foram aclimatados nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, sendo observado um aumento positivo do limite máximo de tolerância térmica (CTMáx) em função do aumento da temperatura de aclimação. Os valores variaram entre 38,56 °C a 41,62°C, sendo observado diferença estatística significativa na CTMáx entre todas as temperaturas de aclimação, nas duas salinidades testadas. Os valores médios da CTMáx em salinidade 6‰ foram de 38,567±0,231, 39,833±0,117, 41,752±0,155 (MÉDIA±S.E.M.) nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C, respectivamente. Já em salinidade 11‰ os valores de CTMáx foram de 39,138±0,172 (20°C), 39,983±0,060 (25°C) e 41,057±0,121(30°C). Foi observado que na menor temperatura (20°C) a CTMáx de *P. caudimaculatus* foi significativamente maior nos animais aclimatados a 11‰, em comparação com os peixes mantidos a 6‰. Por outro, valores estatisticamente maiores de CTMáx foram observados nos animais aclimatados a 6‰, em relação a 11‰, no regime de aclimação a 30°C (Fig. 8).

De forma contrária à CTMax, o aumento da temperatura de aclimação reduziu significativamente os valores de CAT nas duas salinidades testadas (Fig. 9). Em salinidade 6‰, os valores de CAT foram reduzidos de 18,567±0,231 para 11,756±0,155 quando os animais foram aclimatados à 20°C e 30°C, enquanto os valores de CAT variaram de 19,137±0,172 a 11,057±0,121 quando os animais foram aclimatados a 11‰ nas temperaturas de 20 e 30°C (Fig. 9). Não foram observadas diferenças na CAT dos exemplares de *P. caudimaculatus* entre as salinidades de 6 e 11‰, em nenhuma das temperaturas de aclimação testadas.

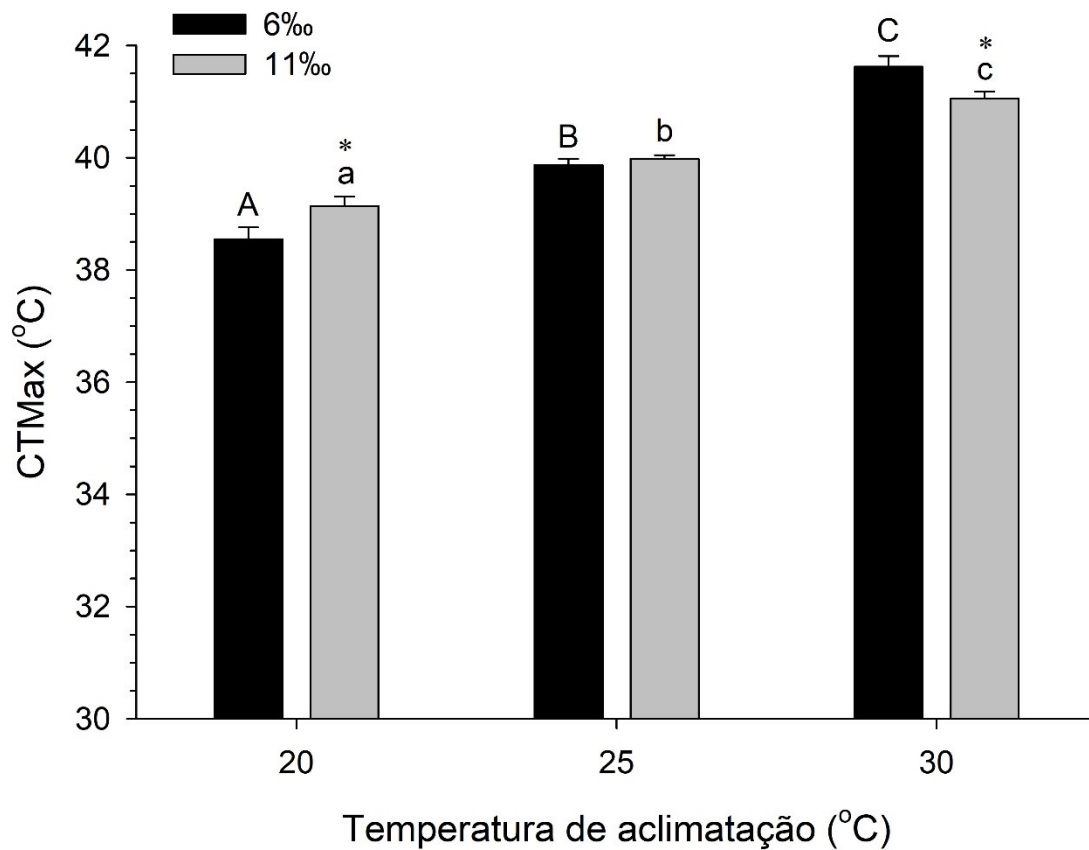


Fig.8. Efeito da temperatura de aclimação sobre a temperatura crítica máxima (CTMáx) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 (barras pretas) e 11 ‰ (barras cinzas). (média ± SEM). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças na CTMáx entre as temperaturas de aclimação nos peixes mantidos a 6 ‰, enquanto letras minúsculas diferentes representam diferenças na CTMáx entre as temperaturas de aclimação dos animais mantidos a 11 ‰. Asteriscos (*) representam diferenças na CTMáx entre as duas salinidades testadas, em uma mesma temperatura de aclimação.

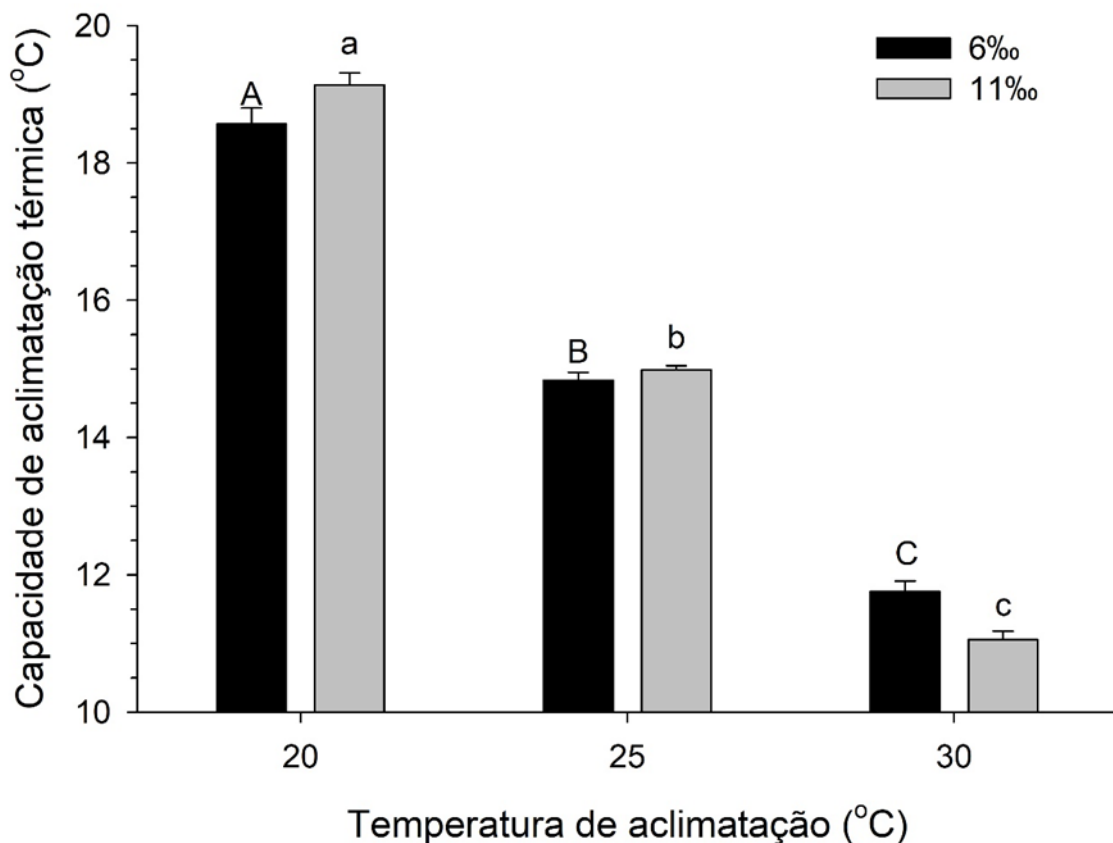


Fig.9. Efeito da temperatura de aclimação sobre a capacidade de aclimação térmica (CAT) (*Acclimation response ratio*_ARR) de *Phalliceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 (barras pretas) e 11 ‰ (barras cinzas). (média \pm SEM). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças na CAT entre as temperaturas de aclimação nos peixes mantidos a 6 ‰, enquanto letras minúsculas diferentes representam diferenças na CAT entre as temperaturas de aclimação dos animais mantidos a 11 ‰. Asteriscos (*) representam diferenças na CAT entre as duas salinidades testadas, em uma mesma temperatura de aclimação.

As taxas de consumo de oxigênio dos exemplares de *P. caudimaculatus* nas temperaturas de aclimação de 20°C, 25°C e 30°C foram de $263,497 \pm 43,338$, $217,892 \pm 61,594$ e $287,803 \pm 28,248$ mgO₂/kg/h, respectivamente. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas na taxa de consumo de oxigênio entre os exemplares de *P. caudimaculatus* entre as três temperaturas de aclimação ($P=0,565$). (Fig. 10). De forma similar, o valor de Q₁₀ calculado entre as temperaturas de aclimação de 20°C e 30°C foi de 1,24, indicando uma baixa responsividade do metabolismo aeróbico da espécie ao aumento de 10°C na temperatura da água. (Fig.10).

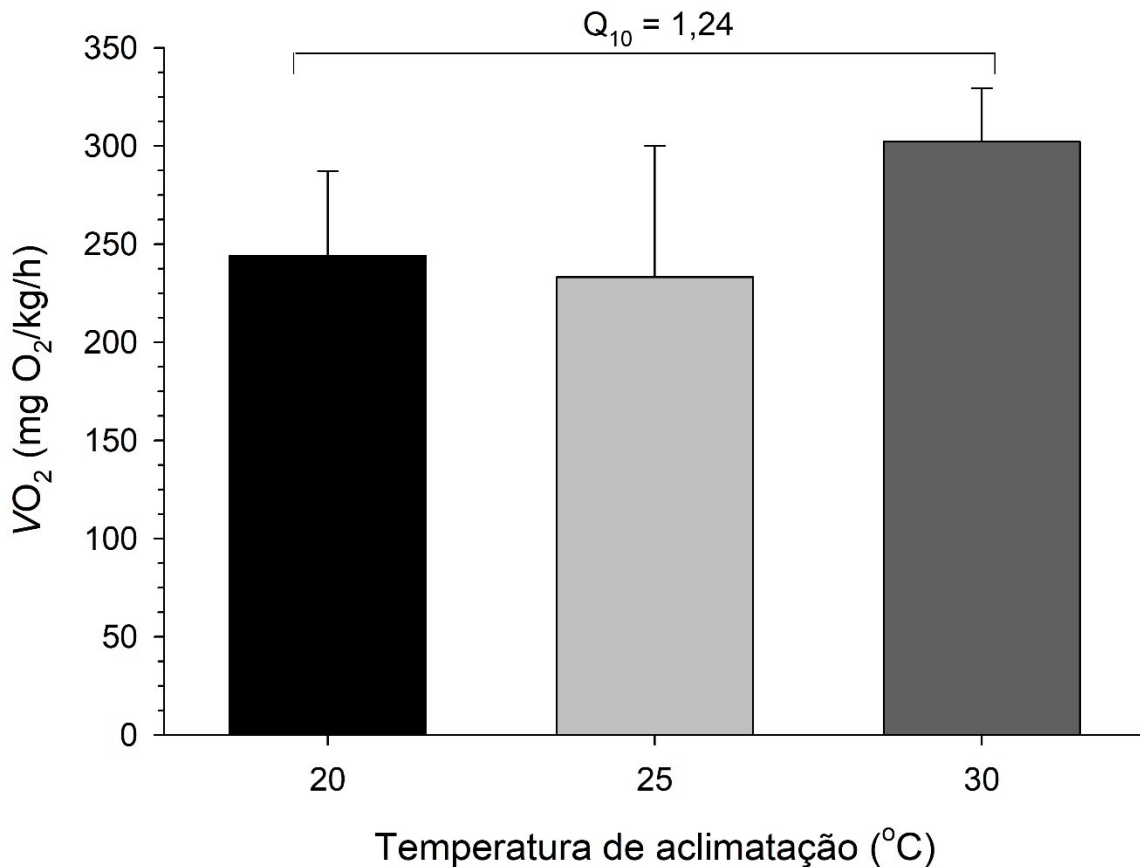


Fig.10. Efeito da temperatura de aclimação sobre a taxa de consumo de oxigênio (VO_2 mg O_2 /kg/h) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 ‰. (média \pm SEM). O valor do coeficiente de temperatura (Q_{10}) calculado entre as temperaturas de 20°C-30°C está notado acima na figura.

O aumento da temperatura de aclimação influenciou positivamente na taxa de excreção de amônia dos peixes, sendo observado um aumento significativo entre 20 e 30°C ($p < 0,001$), e entre 25 e 30°C ($p < 0,05$) na J_{Amm} , mas não entre os exemplares de *P. caudimaculatus* aclimatados a 20°C e 25°C (Fig. 11).

O fluxo líquido de (J_{net}^{Na}) sódio nos exemplares de *P. caudimaculatus* teve uma perda líquida de sódio para meio externo. Entretanto, nas aclimações térmicas foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas de aclimação, onde as maiores perdas líquidas de Na^+ foram observadas nos animais aclimatados em 25°C, em comparação com os peixes mantidos em 20 °C e 30°C (Fig. 12A); (Anexo III). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no (J_{net}^{Na}) entre as temperaturas de 20-30°C ($P = 0,261$). Os valores médios nas três temperaturas de aclimação 20-25-30°C, foram (-5,593 \pm 8,768, -48,607 \pm 10,05, -15,326 \pm 6,798), respectivamente. (MÉDIA \pm S.E.M.) (Fig. 12A). Por outro

lado, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no fluxo líquido de cloreto entre os animais aclimatados as três temperaturas ($P = 0,261$). Os valores médios nas três temperaturas de aclimação 20-25-30°C, foram: $(-7,843 \pm 3,384, -5,323 \pm 3,451, -13,445 \pm 3,619)$, respectivamente. (Fig. 12B)

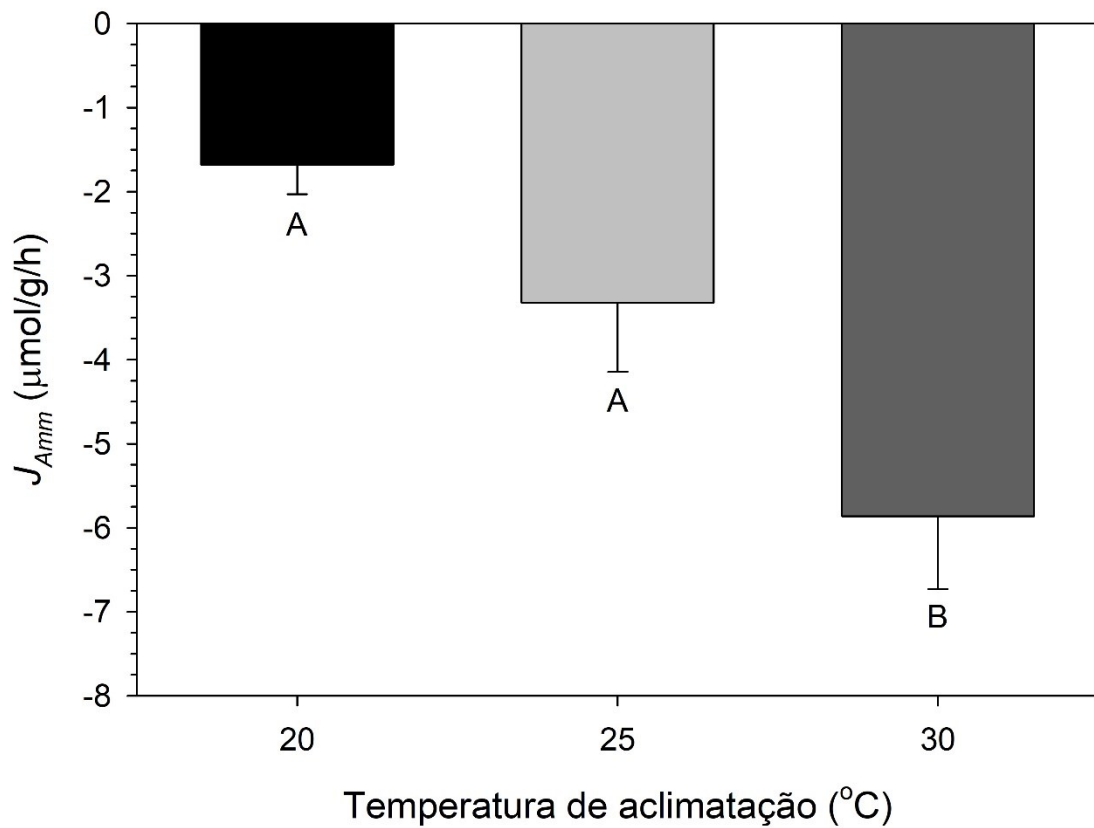


Fig.11. Efeito da temperatura de aclimação sobre a taxa de excreção de amônia (J_{Amm}) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 ‰. (média \pm SEM). Letras diferentes representam diferenças no J_{Amm} entre as temperaturas de aclimação.

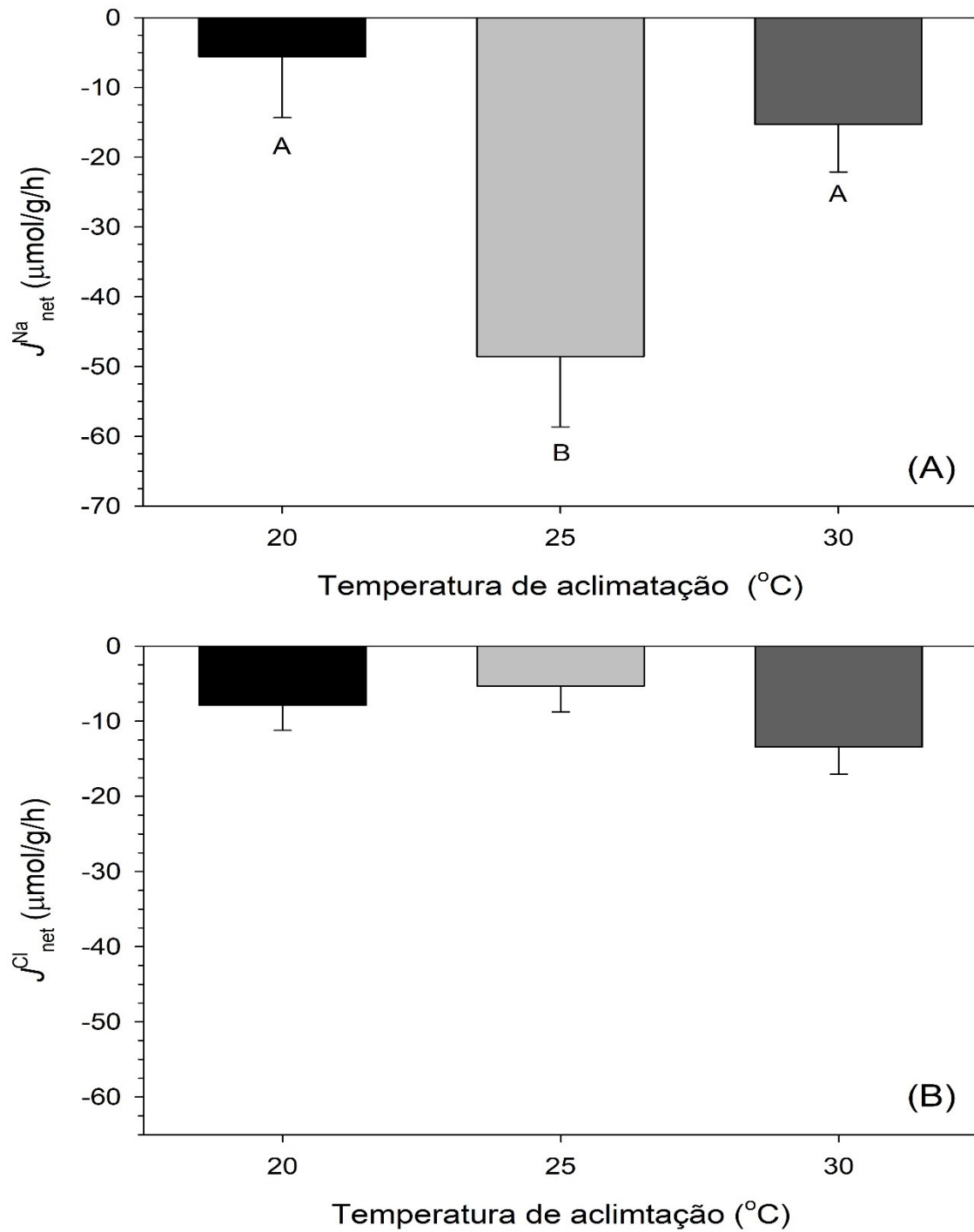


Fig.12. Efeito da temperatura de aclimação sobre os fluxos líquidos de sódio (J_{net}^{Na}) (A) e de cloreto (J_{net}^{Cl}) (B) de *Phalloceros caudimaculatus* mantidos em salinidade 6 ‰. (média \pm SEM). Letras diferentes representam diferenças no fluxo líquido dos íons entre as temperaturas de aclimação.

5. DISCUSSÃO

*5.1. Efeitos da temperatura e salinidade na tolerância térmica de *Phalloceros caudimaculatus**

A temperatura é uma "força motriz ecológica" nos ecossistemas aquáticos que influencia todos os níveis de organização biológica (Guderley, 2004). A temperatura pode influenciar as reações metabólicas e bioquímicas e, por consequência, contribuir com uma parcela significativa sobre as respostas fisiológicas de um organismo. Portanto, a investigação sobre a influência da temperatura ambiental sobre a tolerância térmica – especialmente sobre a temperatura crítica máxima (CTMax) – e suas implicações sobre a saúde dos peixes, tornou-se uma importante área de investigação ao longo dos anos. Altas temperaturas alteram as funções de órgãos vitais como fígado e rim, além de promover desequilíbrio na homeostase interna dos peixes (Sharmin et al., 2015; Hossain et al., 2016). Há uma grande quantidade de trabalhos demonstrando que a tolerância térmica dos peixes depende, em grande parte, da sua história evolutiva, aclimatação térmica ou exposição térmica por longos períodos (Chatterjee et al., 2004; Das et al., 2005; Debnath et al., 2006; Manush et al., 2004).

Existe uma variedade de fatores como, a quantidade de nutrientes na alimentação, saúde dos animais e seu tamanho, (Baker e Heidinger 1996), condições dos peixes nos testes (Irvin et al., 1957), presença de produtos químicos (componentes tóxicos) (Beitinger et al., 2000) e respostas específicas em cada espécie (Das et al., 2004), que influenciam diretamente nos limites superiores e inferiores de tolerância térmica. Além disso, o clima nas estações do ano, altera o regime térmico nos habitats e a exposição de forma diferenciada a variados agentes estressores. Estas exposições, que podem ocorrer de forma rápida e aguda, ou longa e contínua, são ocorrências constantes e inevitáveis no dia a dia de alguns habitats que apresentam profundas oscilações em suas características físico-químicas, como praias e poças de maré. Vários autores evidenciam que as temperaturas mais elevadas da água, por um longo intervalo de tempo, podem aumentar a CTMáx de uma espécie (Madeira et al., 2012; Campos, 2019).

Os peixes geralmente estão adaptados a certas faixas de temperatura sob as quais vivem de forma “confortável”. Quando ocorre o aumento ou diminuição da temperatura além desses níveis, os peixes sofrem com o estresse térmico. Esse tipo de flutuação na temperatura pode criar um desequilíbrio substancial nas atividades fisiológicas normais dos peixes (Beitinger et al., 2000). O valor do CTMáx é afetado por uma série de variáveis como, a diferença na taxa de

mudança de temperatura durante os estudos de tolerância térmica, o tamanho e o fator de condição animal (Baker e Heidinger, 1996), e a presença de compostos letais (Beitinger et al., 2000).

O principal mecanismo de perda do equilíbrio natatório end point (LOE) durante o CTM_{áx} não é claro, mas sabe-se que as temperaturas extremas podem desnaturar proteínas, prejudicar a função enzimática, aumentar a permeabilidade de membranas e causar uma falha do sistema nervoso central (Friedlander et al., 1976). As taxas de aquecimento de 0,3 °C/min utilizadas são frequentemente reportadas em outros trabalhos de tolerância térmica (Lutterschmidt e Hutchison, 1997). Na CTM_{áx}, a taxa de aquecimento utilizada é semelhante a de outros trabalhos sobre tolerância térmica (Bennett e Beitinger, 1997; Healy e Schulte, 2012; Heath et al., 1993; Lowe e Heath, 1969; Wood et al., 2016). Reportamos uma variação da temperatura nos animais de 37,4°C a 42,3°C no CTM_{áx}. (Fig. 8). O aumento em 10°C na temperatura da água resultou no aumento de apenas 3,07°C na CTM_{áx} de *P. caudimaculatus*.

Em outras espécies de poecilídeos foi que os valores de tolerância térmica máxima registradas para *Limia melanonotata* variaram de 39,8°C a 43°C, e estão entre os maiores valores de CTM_{áx} registrados para um peixe poecilídeos (Haney et al., 2003). No entanto, outros animais como *G. affinis* aclimatado a 35°C apresentou CTM_{áx} de 43,5°C (Otto, 1973), e várias espécies de peixes da família Cyprinodontidae apresentaram maior média de CTM_{áx} (Beitinger et al. 2000). Segundo Miranda et al. (2002), em um cenário de aquecimento climático, o acréscimo de 2°C na temperatura atual pode ser alcançadas durante as novas mudanças térmicas globais, dadas as ondas de calor mais longas, com maior frequência e intensidade de calor que vemos em novos relatórios e informações previstas pelos modelos de alterações climáticas (IPCC, 2013, 2018). Provavelmente, a temperatura média local na área de coleta (Ilha Comprida-SP) também irá aumentar. Com isso, os peixes possivelmente presos em poças de maré poderão experimentar condições térmicas estressantes, e próximas aos seus limites térmicos máximos, que podem resultar na morte dos animais, como foi observado para outras espécies de peixes tropicais nas Ilhas Marshall (Hiatt e Strasburg, 1960).

A capacidade de se aclimatar rapidamente a temperaturas elevadas (Chung, 1981; Heath et al., 1993) e tolerar exposição aguda a temperaturas extremas são características adaptativas nos habitats da espécie eurialina *Cyprinodon variegatus variegatus*, onde as oscilações da temperatura podem ocorrer durante o dia, podendo a temperatura máxima exceder 35 °C. O mesmo pode ocorrer com os *P. caudimaculatus* na região de Ilha Comprida, o que indica a necessidade de se adaptarem para sobreviver nessas condições.

Outros estudos sobre as taxas de aquecimento climático feitos pelo IPCC (2014, 2018) estimam que ocorrerá um acréscimo na temperatura entre 1 e 7°C nos próximos 100 anos. Os valores na CTM_{áx} de *P. caudimaculatus* indicam que eles estão próximos a sua temperatura limite, particularmente quando aclimatados a maior temperatura testada (30°C). Assim, os peixes vivendo em regiões com altas temperaturas, principalmente no verão intenso (30-35°C), possivelmente serão afetados com mudanças drásticas no clima. Vários estudos vêm demonstrando que a tolerância ao aquecimento da água é maior em organismos ectotérmicos de regiões temperadas, do que nas tropicais (Vinagre et al., 2016, Campos et al., 2017). Os animais aquáticos que vivem mais distantes de seus limites térmicos são as espécies entre marés de regiões temperadas, apresentando um aumento médio na sua CTM_{áx} de 11,3°C (Vinagre et al., 2016). Além disso, Vinagre et al. (2016) confirmaram esta tendência de que a CTM_{áx} intraespecífica é maior em comparação com espécies tropicais, independentemente do seu habitat, uma vez que os peixes de áreas tropicais vivem muito próximos de seus limites térmicos máximos.

Portanto, a capacidade de aclimação térmica nas espécies tropicais tende a ser baixa em função ao aumento da temperatura. Em *P. caudimaculatus*, a capacidade de aclimação térmica (CAT) foi marcadamente reduzida com o aumento da temperatura de aclimação. Os valores de CAT foram reduzidos em cerca de 6,8°C na salinidade 6‰ (de cerca 19°C para 12°C) com o aumento da temperatura de aclimação de 20°C e 30°C, enquanto em salinidade 11‰ essa redução na CAT foi de cerca de 8°C (Fig. 9). Esses dados indicam que a capacidade de aclimação da *P. caudimaculatus* a regime térmicos aumentados seria menor em condições de salinidades reduzidas no ambiente, principalmente em poças de maré rasas onde os raios solares podem aquecer até mesmo o fundo dos corpos d'água.

Em peixes de região temperada/subtropical da zona entre marés foi observado que a CTM_{áx} foi em média 9,95°C acima da temperatura média da água (24 °C). No presente estudo, esse valor foi de cerca de 11°C, nas duas salinidades, considerando a temperatura máxima ambiental de 30°C. Nos habitats de zona entre marés os animais apresentem valores de CTM_{áx} mais elevados, vivendo ainda mais próximos dos seus limites térmicos. Tal fato se dá porque as temperaturas máximas do habitat podem atingir ou excederem a sua CTM_{áx}. Assim, espécies que vivem abaixo do nível da maré estão em menor perigo (Somero, 2010). Portanto, a capacidade de aclimação em altas temperaturas é reduzida, tornando as espécies mais vulneráveis.

De acordo com Madeira e colaboradores (2012), os organismos que vivem em zona entre marés podem ser expostos à seleção mais forte. Sabendo disso, podemos prever que as populações de *P. caudimaculatus*, por viverem em regiões próximas à praia, onde o aumento na temperatura provavelmente irá empurrá-los para além desses limites. Logo, esse fato é ambientalmente preocupante, pois as espécies que não apresentarem estratégias termorregulatórias, precisarão se deslocar e se refugiar em locais mais frios (Madeira et al., 2012). Dessa forma, os animais tendem a sofrer com o grande estresse térmico, podendo assim comprometer as suas populações. Quando mantidos em regimes térmicos mais elevados, os peixes apresentam um maior custo energético para a manutenção de seus processos homeostáticos, o que pode ocasionar uma série de problemas em seu organismo, comprometendo desse modo, sua sobrevivência. (Madeira et al., 2012)

A temperatura pode provocar alterações que podem favorecer as adaptações evolutivas, revelando quais espécies têm maior capacidade adaptativa para sobreviver às alterações no clima (Pörtner, 2010; Somero, 2010). Logo, espécies de ambientes altamente variáveis tendem a apresentar plasticidade de aclimação limitada (Somero, 2010; Tomanek, 2010), assim como as espécies euritérmicas aclimatadas a maiores temperaturas quando comparada com espécies congêneres estenotérmicas (Tomanek, 2005; Tomanek e Somero, 1999, 2002). A capacidade dos peixes em sobreviver em habitats com temperaturas elevadas e reduzida concentração de oxigênio na água, estaria associada mudanças em seu sistema metabólico para atender à sua demanda energética. Além disso, peixes que vivem em ambientes com altas temperaturas apresentam geralmente, peso e tamanho reduzido, devido ao alto custo metabólico necessários para viver nesses habitats. Nesses ambientes o gasto para sua manutenção obriga o animal reduzir sua energia disponível, principalmente para seu crescimento e a reprodução (Clarke & Johnston, 1999; Gillooly et al., 2001; Gillooly et al., 2002).

Os peixes que habitam locais mais internos da região estuarina, podem sofrer com outras variações, não só de temperatura, mas também com outros fatores abióticos, tais quais: salinidade, oxigênio dissolvido e pH, que podem influenciar em sua maior tolerância à aclimação térmica (Meffe et al., 1995, Morgan et al., 2020). (Fig. 2.4.) A espécie *P. caudimaculatus* vive geralmente em ambientes instáveis, com várias alterações diárias e sazonais de temperatura, além de ocupar diversos locais como águas salobra, águas com pouco oxigênio, alta quantidade de minerais e alguns elementos químicos dissolvidos na água em maior quantidade, assim relatados por Maltchik et al. (2010), que associaram essa espécie a áreas

úmidas com muita diversidade de habitat e regiões ricas em matéria orgânica como os manguezais. Muito embora os indivíduos de *P. caudimaculatus* aclimatados a 6‰ apresentaram maior CTMax, e CAT similar, aos peixes mantidos a 11‰, a menor variação vista na CAT (6,8°C) entre as temperaturas de aclimação evidencia uma maior sensibilidade da espécie à aumentos da temperatura em menores salinidades.

5.2. Efeitos do aumento da temperatura sobre o metabolismo de rotina e excreção de amônia de *Phalloceros caudimaculatus*

No presente estudo não foi observada uma relação direta de aumento nas taxas de consumo de oxigênio de *P. caudimaculatus* com o aumento da temperatura de aclimação. Por outro lado, o aumento no consumo de oxigênio em função do aumento da temperatura de aclimação já foi observado em diferentes espécies, tais como *Labeo rohita* e *Cyprinus carpio* (em aclimação 25, 30 e 35°C faixa de consumo 60-120 mg O₂⁻¹kg⁻¹h) (Chatterjee et al. 2004), *Horabagrus brachysoma* (em aclimação 15, 20, 26, 31, 33 e 36°C faixa de consumo 60-240 mg O₂⁻¹kg⁻¹h) (Dalvi et al. 2009) e *Anabas testudineus* (em aclimação 25,30 e 35°C faixa de consumo 120-200 mg O₂⁻¹kg⁻¹h) (Sarma et al. 2010).

A taxa média de consumo de oxigênio dos exemplares de *P. caudimaculatus* foi de (0,263±0,0433) na temperatura de aclimação de 20°C e salinidade 6‰. Com relação à aclimação de 25°C, ocorreu uma discreta redução 0,218±0,0616. Na temperatura de aclimação 30°C, ocorreu um discreto aumento do valor médio das taxas (0,288±0,0282), sendo uma diferença de 0,07 mgO₂⁻¹/kg⁻¹/h. Essa redução pode estar relacionada com a temperatura ótima que os animais estão acostumados a viver, entre 20-25°C, nas quais as exigências metabólicas são menores e o seu suprimento de oxigênio atende suas necessidades metabólicas. Embora as taxas de consumo de oxigênio apresentem uma tendência de aumento em função do aumento de temperatura, esses valores não diferiram estatisticamente entre si. (Fig. 10).

Em geral, a elevação da temperatura da água promove o aumento das exigências metabólicas e do gasto energético nas espécies e, conseqüentemente, um aumento nas taxas de consumo de oxigênio. Altas temperaturas e pouco oxigênio são fatores que influenciam a distribuição de peixes (Campos, 2019). Assim, as espécies com capacidade para sobreviver a temperaturas mais elevadas e menos oxigênio dissolvido na água, conseguem explorar habitats extremos (Almeida-Val et al., 1995; Anjos et al., 2008). No entanto, em situações de estresse térmico ou em ambientes hipóxicos/anóxicos, ocorre uma queda progressiva no consumo de

oxigênio que está muitas vezes associada a um maior recaimento sobre o metabolismo anaeróbico para suprir as demandas metabólicas teciduais (Almeida-Val et al., 2000; Hochachka e Somero, 2002).

Segundo Cech e Brauner (2011) o aumento da temperatura e a conseqüente diminuição da solubilidade de oxigênio na água causa estresse aos peixes. A capacidade de fornecimento de oxigênio em relação a sua demanda metabólica é diretamente relacionada ao tamanho de sua janela térmica (Pörtner e Farrell, 2008). O eescopo aeróbico, a teoria da capacidade de Tolerância Térmica Limitada pelo Oxigênio (OCLTT) são controlados pela incapacidade do organismo de fornecer oxigênio suficientemente aos tecidos em função do estresse térmico (Pörtner & Farrell, 2008; Pörtner e Knust, 2007). De acordo com essa teoria, o aumento da temperatura acima da temperatura de aclimação, promove um sucessivo e rápido aumento do consumo de oxigênio. Como efeito líquido, ocorre a redução na quantidade na pressão parcial de oxigênio no sangue quando se está próximo da temperatura crítica (Fry e Hart, 1948; Pörtner et al., 2017). Diante disso, os peixes exploram múltiplas estratégias para otimizar o transporte de oxigênio no sangue. Outra estratégia para solucionar o transporte do oxigênio seria reduzir os gastos energéticos (Haney et al., 2003). De acordo com este autor, a diminuição do metabolismo reduz os gastos energéticos nas salinidades elevadas; essa resposta aumenta o tempo de tolerância às condições adversas. Mudanças morfológicas na brânquia poderiam comprometer o sistema osmorespiratório nos peixes, dificultando ainda mais as trocas de gás oxigênio devido a redução da área de superfície com o aumento da espessura do epitélio (Randall et al., 1972).

As respostas metabólicas dependem da temperatura, período de aclimação, e das espécies a serem estudadas (Dent e Lutterschmidt, 2003; Díaz et al., 2007). Dent & Lutterschmidt (2003), sugeriram que os peixes de água doce demonstram plasticidade fisiológica quando são capazes de recuperar ou se aproximar de seu ponto de ajuste metabólico (ou seja, alterações quantitativas ou qualitativas na expressão enzimática e reações bioquímicas), em que os ambientes são termicamente instáveis. Essa relação prevê que peixes com maior plasticidade nas taxas metabólicas terão um coeficiente de temperatura (Q_{10}) menor. No presente estudo, *P. caudimaculatus* apresentou um coeficiente baixo de Q_{10} (1,24) após um aumento de 10°C na água, sugerindo que o metabolismo da espécie é pouco responsivo ao aumento da temperatura da água dentro da faixa de temperatura estudada. Isso mostra uma sensibilidade térmica da espécie menor do que a relatada para outras espécies euritérmicas, como a barramundi tropical (*Lates calcarifer* com um Q_{10} de ~2,5) (Norin et al., 2014), bem como goby redondo temperado

(*Neogobius melanostomus*, $Q_{10} = 2,6$) (Christensen et al., 2021), ou lúcioperch (*Sander lucioperca*, $Q_{10} = 2,0$) (Frisk et al., 2012). Na espécie *H. brachysoma* o menor valor de Q_{10} foi observado entre 31 e 33°C (1,53), indicando menor efeito do aumento da temperatura sobre o metabolismo (Dalvi et al., 2009). Assim, a espécie teria uma melhor capacidade de aumentar seu metabolismo aeróbico entre essas temperaturas. Brett (1971) e Kellog e Gift (1983) apontaram que a temperatura preferencial de uma espécie coincide com a temperatura ideal para vários processos fisiológicos, particularmente para o crescimento (Tsuchida, 1995). Kita et al. (1996) relatam que a temperatura final preferencial de uma espécie corresponde à temperatura na qual o aumento da concentração de oxigênio e taxa de consumo com a temperatura é reduzida gradualmente. Assim, menores valores de Q_{10} indicariam que que mais energia estaria disponível para desenvolvimento dos peixes (Díaz et al., 2007).

Na maioria dos teleósteos que se alimentam regularmente, crescem continuamente, nadam ativamente e vivem em ambientes sob condições normais, a principal excreta nitrogenada é a amônia, e se seus mecanismos de excreção para o meio aquático ocorrem através das brânquias (Wood, 2001). Em peixes teleósteos, o aumento da produção de energia pelo metabolismo aeróbico em função do aumento da temperatura da água, promove um maior recaimento sobre a oxidação de proteínas, resultando em maior excreção de amônia para o meio externo (Bucking, 2017). Nos exemplares de *P. caudimaculatus*, as taxas de excreção de amônia aumentaram significativamente em função do aumento da temperatura, particularmente em 30°C, onde as taxas de excreção de amônia foram em torno de 1,8 e 3,3 vezes mais elevadas do que nos peixes aclimatados a 25°C e 20°C, respectivamente. Assim, os dados sugerem uma maior oxidação de proteínas para a manutenção da taxa metabólica dos peixes nas maiores temperaturas. (Fig. 11).

No ambiente aquático, o nitrogênio pode ser encontrado sob diferentes formas, dentre outras, a de nitrito, nitrato, amônia, óxido nitroso e amoníaco. As variações de temperaturas diárias e sazonais, mais a disponibilidade de alimento são, provavelmente, o fator mais importante sobre o nitrogênio no metabolismo de peixes no seu ambiente natural. No entanto, na natureza, é provável que a alimentação e a temperatura sejam dependentes em vez de variáveis independentes. (Wood, 2001). Em peixes oriundos de habitats de água doce, em geral, quando mantidos em meio hiperosmótico, tendem a apresentar maiores taxas de excreção de amônia (e.g. truta arco-íris e guppy) em comparação aos animais mantidos em água doce. No entanto, para a espécie *Fundulus heteroclitus* a aclimação a água doce aumenta a taxa de excreção de amônia (Bucking, 2017).

Nos peixes, a amônia é excretada preferencialmente pelas brânquias na forma gasosa NH_3 ,

utilizando a simples difusão do NH_3 por intermédio do transportador glicoproteico Rhesus (Rh), a favor do gradiente de pressão do NH_3 entre o sangue e o ambiente externo (Bucking, 2017). No entanto, diversos estudos têm evidenciado que a excreção da forma iônica da amônia (NH_4^+) pode ser acoplada a absorção de Na^+ , principalmente nos peixes de água doce, utilizando diferentes mecanismos de transporte (Wright e Wood, 2012; Bucking 2017). Além disso, o controle da homeostase osmótica celular, envolve a regulação das concentrações de variados osmólitos orgânicos intracelulares, tais como aminoácidos, para manutenção da pressão osmótica, já os íons inorgânicos em grandes concentrações ocasionam efeitos deletérios nas células (Edwards e Marshall, 2012).

A produção endógena de amônia nos animais ocorre através do catabolismo de aminoácidos, por meio de dois mecanismos principais: (a) através da desaminação de aminoácidos, como o glutamato, pela ação de enzimas específicas, como a glutaminase e a glutamato desidrogenase (GDH), ou (b) através da transaminação oxidativa de L-aminoácidos (como a alanina e o aspartato), produzindo glutamato e α cetoácidos, (Ip e Chew, 2010; Bucking, 2017). Através da transaminação de L-aminoácidos em glutamato, e sua posterior desaminação via glutamato desidrogenase (GDH), amônia e D-cetoácidos são gerados como produtos, sendo os últimos utilizados como substrato no ciclo de Krebs (Ballantyne, 2001; Bucking, 2017).

No entanto, vários fatores, como a temperatura e consumo de oxigênio são conhecidos por alterar a taxa de oxidação de aminoácidos, conseqüentemente, a produção e os níveis de amônia, onde o conteúdo de proteínas da dieta e a frequência de alimentação influenciam diretamente o catabolismo de aminoácidos (Ballantyne, 2001; Bucking, 2017). Confirmando a alta dependência do metabolismo dos peixes pela oxidação de proteínas (Ballantyne, 1997; Wood, 2001). O maior recaimento sobre a oxidação de aminoácidos resulta no aumento da produção endógena de amônia e, conseqüentemente, da taxa de excreção de amônia. Em conjunto, essas respostas metabólicas são consideradas um mecanismo adaptativo que disponibiliza reservas energéticas durante a exposição aguda a agentes externos causadores de estresse. No caso de *P. caudimaculatus*, vemos que a aclimação por 7 dias também resultou em maiores taxas de excreção de amônia na maior temperatura testada (30°C), sugerindo uma maior utilização das reservas enérgicas dos animais em virtude do estresse térmico provocado pelo maior regime térmico do ambiente.

5.3. Efeitos do aumento da temperatura sobre respostas ionorregulatórias de *Phalloceros caudimaculatus*

Os sais (cátions e ânions) dissolvidos no plasma são essenciais para as funções metabólicas em qualquer vertebrado, principalmente Na^+ e Cl^- , sendo absorvidos pelos peixes por meio de mecanismo especializados nas brânquias (peixes de água doce) e no trato gastrointestinal (peixes marinhos) e por meio da alimentação, sendo transportados para o sangue e excretados para o meio externo por células especializadas (ionócitos) localizadas no epitélio das brânquias, rins e da pele (Edwards e Marshall, 2012).

Ao longo do processo evolutivo, os peixes desenvolveram três diferentes estratégias para manter sua homeostase iônica e osmótica em função das condições encontradas no meio externo. A osmoconformação, onde a osmolaridade do fluido extracelular dos animais é mantida em nível similar ao ambiente externo (e.g. água do mar e/ou estuários), a hipoosmoregulação, onde os peixes regulam a composição de osmólitos no plasma para manter a sua composição abaixo da concentração do meio externo (e.g. água do mar e/ou estuários), e a hiperosmoregulação, onde os animais mantêm seus fluidos internos mais concentrados que o meio externo mais diluído (e.g. água doce) (Edwards e Marshall, 2013). Assim, quando as espécies eurialinas se movem para o ambiente marinho ocorre o aumento da osmolaridade plasmática em decorrência do ganho de sais e perda de água, resultando em níveis mais elevados de Na^+ e Cl^- no plasma, associado ao aumento da atividade das enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC) nas brânquias (Hoar, 1988; McCormick et al., 2009). Na segunda fase, chamada de “período regulatório”, a osmolaridade e concentração de sais dissolvidos no plasma tendem a ser ativamente reguladas para que estas sejam mantidas dentro dos limites fisiológicos da homeostase (Prodocimo e Freire, 2006).

As brânquias são vitais nos peixes elas exercem inúmeras funções, visto que, além de serem o principal local onde acontece as trocas gasosas, também estão relacionadas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, excreção de compostos nitrogenados e a ionorregulação. Ao longo da evolução, as brânquias foram sofrendo adaptações morfo-funcionais, sendo necessárias para que os peixes obtivessem sucesso no povoamento de vários ambientes. Através da literatura as primeiras investigações sobre os mecanismos de transporte de íons em peixes ocorreram na década de 30, e já se sabia que o principal sítio de regulação iônica eram as brânquias (Evans et al., 1982). Mecanismos morfofuncionais de ajuste à salinidade

ambiental como migração de célula e alterações na superfície de contato com o meio também foram descritas (Fanta et al., 1995). Tendo em vista as necessidades dos animais aquáticos exporem ao ambiente grandes áreas de um tecido bem delicado, como as brânquias, estas são utilizadas como indicadores biológicos da qualidade de água (Machado, 1999).

Os peixes apresentam a capacidade de conservar a concentração osmótica de seu fluido corporal relativamente constante na maioria das situações, diferente da concentração do meio externo. O aumento da temperatura da água, combinado com baixos níveis de oxigênio e altas concentrações de amônia promove mudanças no equilíbrio iônico e ocasiona uma maior troca de íons entre o peixe e o meio ambiente. A regulação iônica acontece por vários fatores, um deles é a temperatura, ela promove alterações nas concentrações dos íons, principalmente no Na^+ e Cl^- . Assim, o aumento da temperatura resulta na desestabilização das junções paracelulares (“Gap junctions”), tornando o epitélio branquial dos peixes permeável a passagem de íons. Assim, em ambientes com temperaturas elevadas as perdas iônicas dos íons sódio, cloreto, potássio e cálcio são estimuladas e ocorrem por difusão paracelular na superfície branquial (Schmidt e Nielsen 1999; Baldisserotto e Val, 2002).

Além disso, oscilações em parâmetros ambientais, tais como a temperatura e salinidade, podem promover alterações em mecanismos de transporte transcelular de íons nas brânquias de peixes teleósteos resultando em severos distúrbios osmo-ionoregulatórios. No ambiente marinho e em água salobra, a secreção de cloreto pelas brânquias dos peixes envolve a participação do cotransportador NKCC, a presença do canal na membrana apical e também a membrana basolateral dos ionócitos. Em peixes marinhos, a ação da enzima NKA pode criar um potencial elétrico intracelular negativo, ao retirar íons Na^+ do citoplasma das células. Tal carga negativa intra-celular seria responsável pela saída de Cl^- para o meio externo, e o excesso de Na^+ seria eliminado via rota paracelular, entre as células de cloreto. Segundo Goss et al. (1992), a localização dos transportadores iônicos nas brânquias de peixes de água doce, e a quantidade de ionócitos nestes animais, é bastante reduzida se comparada aos peixes de habitat marinho. Em situações estressantes como à variação de salinidade ou aumento abrupto de temperatura os mecanismos e processos fisiológicos relacionados a função branquial resultam na menor atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC), concomitante ao aumento da atividade da H^+ -ATPase (VATPase). Assim como, reduções significativas nos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- , tal qual visto para diferentes espécies de peixes como *Oncorhynchus nerka* (Shrimpton et al., 2005), *Anguilla anguilla* (Wilson et al., 2007) e

Salmo trutta (Tipsmark et al., 2002). Entre algumas espécies o custo energético para osmorregulação apresentam uma grande variação. Cerca de 20 a 68% da taxa metabólica, analisada por meio da taxa de consumo de oxigênio, é gasta no processo de manutenção da homeostase iônica e osmótica (Boeuf e Payan, 2001). Assim, alterações na salinidade e na temperatura do meio tendem a ter um grande efeito sobre o catabolismo de aminoácidos livres no meio intracelular de peixes, fazendo assim sua oxidação para a produção de ATP para suprir a demanda energética para favorecer a manutenção da homeostase iônica e osmótica dos animais (Branchard e Grosell, 2006; Frick e Wright, 2002).

Além disso, peixes submetidos a situações estressantes, tal como o aumento da temperatura da água, apresentam respostas endócrinas que incluem a hipersecreção de catecolaminas e corticoesteróides (como o cortisol), parâmetros considerados indicadores de resposta primária ao estresse, e que muitas vezes são acompanhados de distúrbios no equilíbrio ácido-base dos animais (Engelhardt et al., 1981; Alkindi et al., 1996; Stephens et al., 1997). Esses mediadores químicos, por sua vez, disparam respostas fisiológicas e bioquímicas que resultam em efeitos considerados como respostas secundárias, que incluem hiperglicemia, consumo das reservas de glicogênio, inibição da síntese proteica e lipólise (Winkaler et al., 2001). A perturbação do equilíbrio hidromineral também é considerada uma resposta secundária ao estresse. Segundo Wendelaar Bonga (1997), diversos tipos de estressores prejudicam o equilíbrio iônico nos peixes. Alterações nos parâmetros como níveis de potássio, cloreto, sódio e cálcio podem ser caracterizado como desequilíbrio ácido-base (Mariano et al., 2009).

Em ambientes hiposmóticos (água doce e salobra abaixo do ponto isosmótica da espécie) – tal como a salinidade 6‰ para *P. caudimaculatus* – os íons (principalmente sódio e cloreto) são continuamente perdidos por difusão pelos peixes para o ambiente. Esta perda de sais é repostada pela reabsorção durante a ingestão de alimento ou diretamente do ambiente através de processos dependentes de energia em células especializadas presentes no epitélio branquial e em outros órgãos dos peixes. Em situações de estresse, este processo fisiológico é prejudicado em função do redirecionamento de energia para outros processos vitais, considerados mais importantes naquele momento. Além disso, aumento de temperatura pode aumentar as perdas líquidas de sais para o meio, tal como visto para a espécie tropical *Metynnis hypsauchen* onde o aumento de 7°C na temperatura resulta em um aumento expressivo nas perdas iônicas líquidas de Na^+ ($J_{\text{Na}}^{\text{Net}}$) e Cl^- ($J_{\text{Cl}}^{\text{Net}}$) pelas brânquias da espécie, quando exposta por 6 horas a 33°C em água do Rio Negro (Baldisserotto e Val, 2002).

Já em três espécies de riachos de terra-firme da Amazônia Central, *Apistogramma agassizii*, *Pyrrhulina aff. brevis* e *Hyphessobrycon melazonatus*, aclimatados por 30 dias, um aumento de 4,5°C promoveu o aumento nas perdas líquidas de sódio nas brânquias em 1,2, 1,7 e 2,5 vezes, respectivamente (Campos, 2019). Além disso, a espécie *A. agassizii* apresentou aumento significativo nas perdas líquidas de K^+ (2,5 vezes), Cl^- ($J^{Cl}Net$) (4,2 vezes) e excreção de amônia (J_{Amm_N}) (4,0 vezes) (Campos, 2019). No presente estudo, foi observado que os indivíduos de *P. caudimaculatus* apresentam controle das perdas líquidas de Na^+ e Cl^- em função do aumento da temperatura da água. Mesmo em altas temperaturas (30°C), que determinamos para investigar o cenário climático extremo (i.e. 29-30 °C), observamos os valores médios de perda líquida cloreto ($-13,445 \pm 3,619$) e de sódio ($-15,326 \pm 6,798$) similares as perdas observadas nos peixes aclimatados a 20°C. No entanto, maiores perdas líquidas de Na^+ foram observadas nos peixes aclimatados a 25°C, em comparação aos animais mantidos a 20°C e 30°C. A perda líquida de Na^+ ($J^{Na}net$) na temperatura de aclimação de 25°C foi aproximadamente 10 vezes maior que o fluxo na temperatura de 20°C, e 3 vezes maior na de 30°C, sugerindo que a exposição prolongada a essa temperatura pode resultar em alterações na permeabilidade branquial ao Na^+ , ou mesmo inibir mecanismos específicos de transporte desse íon. Em conjunto, nossos dados indicam que o aumento da temperatura da água (20°C a 30°C) não promoveu alterações severas nas respostas ionoregulatórias da espécie. Por fim, o presente estudo foi a primeira investigação fisiológica sobre a tolerância térmica nessa espécie de peixes que vive em águas salobras na Mata Atlântica. Estudos futuros devem examinar os efeitos interativos de múltiplos fatores estressores sobre diferentes variáveis fisiológicas medidas para entender as consequências sobre a fisiologia da espécie sobre futuros cenários de aquecimento global.

6. CONCLUSÕES

O aumento da temperatura de aclimação, simulando cenários extremos para as mudanças climáticas (IPCC, 2013, 2018), promove um aumento do limite máximo de tolerância térmica (como indicado pela CTM_{áx}) e uma redução da capacidade de aclimação térmica na espécie *Phalloceros caudimaculatus*. Os valores indicam que os peixes são sensíveis ao aumento da temperatura e estariam próximos aos seus limites térmicos nesse regime térmico (30°C) no ambiente natural. Por outro lado, o aumento da temperatura de aclimação não influenciou as taxas de consumo de oxigênio da espécie, mas promoveu aumento substancial na taxa de excreção de amônia. Além disso, pequenas alterações no padrão ionoregulatório da espécie foram observadas, especialmente nas perdas líquidas de Na⁺ ($J^{\text{Na}}_{\text{net}}$) que foram significativamente aumentadas na temperatura de 25°C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akanksha, J. ; Brahma N. & Singh, S.P. 2010. Exploring Biodiversity as Bioindicators for Water Pollution. Uttar Pradesh State Biodiversity Board. National Conference on Biodiversity, Dev and Poverty Alleviation; 22: 50–56.
- Alkindi A.Y.A.; Brown J.A.; Waring, C.P. & Collins, J.E. 1996. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and hematological parameters in flounder exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Fish Biology*, 49(6): 1291-1305.
- Almeida-Val, V.M.F. & Hochachka, P.W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. 45-55. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, (eds Elsevier Science). Environmental and Ecological Biochemistry, Amsterdam.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Duncan, W.P.; Souza, F.C.A.; Paula-Silva, M.N. & Land, S. 2000. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 125: 219-226.
- Angilletta, M.J.Jr. & Sears M.W. 2004. Evolution of Thermal Reaction Norms for Growth Rate and Body Size in Ectotherms: An Introduction to the Symposium. *Integrative and Comparative Biology*, 44(6): 401-402.
- Anjos, M.B.; De Oliveira, R.R. & Zuanon, J. 2008. Hypoxic environments as refuge against predatory fish in the Amazonian floodplains. *Brazilian Journal of Biology*, 68: 45–50.
- Baker, S.C. & Heidinger, R.C. 1996. Upper lethal temperature of fingerling black crappie. *Journal of Fish Biology*, 48:1123–1129
- Baldisserotto, B. & Val, A.L. 2002. Fluxos iônicos em *Metynnis hypsauchen*, um teleósteo do rio Negro, Amazonas, exposto a aumento de temperatura. *Brazilian Journal of Biology*. [online], 62(4b): 749-752. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000500003>.
- Baldisserotto, B. 2002. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria, Ed. UFSM, 212p.
- Ballantyne, J.S. 1997. Jaw: The Inside story. The Metabolism of Elasmobranch Fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(4): 703-742.
- Ballantyne, J.S. 2001. Amino acid metabolism. *In: Wright, P.A. & Anderson, P. (Eds.). Nitrogen Excretion*. San Diego, Academic Press, pp. 77–108.
- Barton, B.A.; George, K. & Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- Beitinger, T.L. & Bennett, W.A. 2000. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 58(3): 277-288.
- Beitinger, T.L.; Bennett, W.A. & McCauley, R.W. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 58: 237–275.

- Beitinger, T.L. & W.A. Bennett, 2000. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 58: 277- 288.
- Beitinger, T.L.; Bennett W.A. & McCauley, R.W. 2000. temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental biology of fishes*, 58: 237-275.
- Bennett, W.A. & Beitinger, T.L. 1997. Temperature tolerance of the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegates*. *Copeia 1*: 77–87.
- Bennett, W.A.; Currie, R.J.; Wagner, P.F. & Beitinger, T.L. 1997. Cold tolerance and potential overwintering of the Red-Bellied Piranha, *Pygocentrus nattereri*, in the United States. *Transactions of the American Fisheries Society*, 126(5): 841-849.
- Boeuf, G. & Payan, P. 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C*, 130: 411- 423.
- Blanchard, J. & Grosell, M. 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? *Aquatic toxicology*, 80(2): 131-139.
- Breau, C.; Cunjak, R.A. & Peake, S.J. 2011. Behavior during elevated water temperatures: can physiology explain movement of juvenile Atlantic salmon to cool water? *Journal of Animal Ecology*, 80(4): 844-853.
- Brett, J.R. 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 21(5): 1183-1226.
- Brett, J.R. 1971. Energetic responses of salmon to temperature. A study of thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *American zoologist*, 11(1): 99-113.
- Brett, J.R., & Groves, T.D.D. 1979. Physiological energetics. *Fish physiology*, 8(6): 280-352.
- Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. *In*: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.). *Fish Physiology*, vol. VIII. London, Academic Press, pp. 599–675.
- Brey, T.; Pearse, J.S.; Basch, L.; McLintock, J.B. & Slattery, M. 1995. Growth and production of *Sterechinus neumayeri* (Echinoidea: Echinodermata) in McMurdo Sound. Antarctica. *Marine Biology*, 124(2): 279-292.
- Bozinovic, F.; Calosi, P. & Spicer, J.I. 2011. Physiological correlates of geographic range in animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1): 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145055>
- Bucking, C. 2017. A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. *Journal of Comparative Physiology B*, 187(1): 1-18. doi:10.1007/s00360-016-1026-9
- Calosi, P.; Bilton, D.T. & Spicer J.I. 2008. Thermal tolerance, acclimatory capacity and vulnerability to global climate change. *Biology letters*, 4(1): 99-102.
- Campos, D.F.; Jesus, T.F.; Kochhann, D.; Heinrichs-Caldas, W.; Coelho, M.M. & Almeida-Val, V.M.F. 2017. Metabolic rate and thermal tolerance in two congeneric Amazon fishes: *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 and *Paracheirodon simulans* Géry, 1963 (Characidae). *Hydrobiology*, 789:

- Campos, D.F. 2019. Os peixes amazônicos vivem perto dos seus limites térmicos? O efeito das mudanças climáticas sobre o metabolismo de peixes de Igarapé da Amazônia Central. Manaus-AM. Instituto Nacional de pesquisa da Amazônia – INPA divisão do curso da Pós-Graduação em Biologia de Águas Doce e Pesca Interior – DIBAD, Manaus-AM, 117p. (Tese de Doutorado)
- Carveth, C. J.; Widmer, A. M. & Bonar, S.A. 2006. Comparison of upper thermal tolerances for native and nonnative fish species in Arizona. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135:1433–1440.
- Cech, J.J. & Brauner, C.J. 2011. Respiration: an introduction. In: Farrell, A.P. (Ed.), **Encyclopedia of Fish Physiology: from Genome to Environment**. Elsevier, pp. 791–795.
- Chabot, D. & Guénette, S., 2013. Physiology of water breathers: Effects of temperature, dissolved oxygen, salinity and pH. Ch. 2, 16–44p. In: Shackell, N.L.; Greenan, B.J.W.; Pepin, P.; Chabot, D.; Warburton, A. (eds.). **Climate Change Impacts, Vulnerabilities and Opportunities Analysis of the Marine Atlantic Basin**. Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences, 3012p.
- Chatterjee, N.; Pal, A.K.; Manush, S.M.; Das, T. & Mukherjee, S.C. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Labeo rohita* and *Cyprinus carpio* early fingerlings acclimated to three different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 29: 265–270. doi:10.1016/j.jtherbio.2004.05.001
- Christensen, E.A.F.; Norin, T.; Tabak, I.; Van Deurs, M. & Behrens, J.W. 2021. Effects of temperature on physiological performance and behavioral thermoregulation in an invasive fish, the round goby. *Journal of Experimental Biology*, 224(1): 1–10. <https://doi.org/10.1242/jeb.237669>.
- Chung, K.S. 1981. Rate of acclimation of the tropical saltmarsh fish *Cyprinodon dearborni* to temperature changes. *Hydrobiologia*, 78: 177–181.
- Chung, K. & Méndez, S. 1993. Tolerancia termica comparativa en algunos peces tropicales de Venezuela. *Ciencia*, 1(1): 1-7.
- Clarke, A. & Johnston, N.M. 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology*, 68: 893–905.
- Comte, L. & Olden, J. D. 2017a. Climatic vulnerability of the world's freshwater and marine fishes. *Nature Climate Change*, 7(10): 718–722. <https://doi.org/10.1038/nclimate3382>
- Comte, L. & Olden, J. D. 2017b. Evolutionary and environmental determinants of freshwater fish thermal tolerance and plasticity. *Global Change Biology*, 23(2): 728–736. <https://doi.org/10.1111/gcb.13427>
- Cowles, R.B. & Bogert, C.M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 83(5): 265–296.
- Dahlke, F.T.; Wohlrab, S.; Butzin, M. & Pörtner, H. 2020. Thermal bottlenecks in the life cycle define climate vulnerability of fish. *Science*, 369(6499): 65–70. <https://doi.org/10.1126/science.aaz3658>
- Dalvi, R.S.; Pal, A.K.; Tiwari, L.R.; Das, T. & Baruah, K. 2009. Thermal tolerance and oxygen consumption rates of the catfish *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to acclimated to different temperatures. *Aquaculture*, 295(1-2): 116-119.
- Das, T.; Pal, A.K.; Chakraborty, S.K.; Manush, S.M.; Chatterjee, N. & Mukherjee, S.C. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of Indian Major Carps acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 29: 157–163.

- Das, T.; Pal, A.K.; Chakraborty, S.K.; Manush, S.M.; Sahu, N.P. & Mukherjee, S.C. 2005. Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 30: 378–383.
- Debnath, D.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Baruah, K.; Yengkokpam, S.; Das, T. & Manush, S.M. 2006. Thermal tolerance and metabolic activity of yellowtail catfish *Pangasius pangasius* (Hamilton) advanced fingerlings with emphasis on their culture potential. *Aquaculture*, 258: 606–610. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.037
- Dent, L. & Lutterschmidt, W.I. 2003. Comparative thermal physiology of two sympatric sunfishes (Centrarchidae: Perciformes) with a discussion of microhabitat utilization. *Journal of Thermal Biology*, 28: 67–74.
- Deutsch, C.A.; Tewksbury, J. J.; Huey, R.B.; Sheldon, K.S.; Ghalambor, C.K.; Haak, D.C. & Martin, P.R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18): 6668–6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
- Diaz, F.; Re, A.D.; Gonzalez, R.A.; Sanchez, L.N.; Leyva, G. & Valenzuela, F. 2007. Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) acclimated to different temperatures. *Aquaculture research*, 38(13): 1387–1394.
- Edwards, S.L. & Marshall W.S. 2012. Osmoregulation and euryhalinity in fishes, 1-44. *In*: McCormick, S.D.; Farrel A.P. Brauner C. (Eds). **Euryhaline Fishes**. Oxford, Academic Press. Vol 32.
- Edwards, S.L. & Marshall, W.S. 2012. Principles and patterns of osmoregulation and euryhalinity in fishes. Vol. 32, 1-44. *In*: **Fish physiology**. Oxford, Academic Press.
- Edwards, S.L. & Marshall, W.S. 2013. Principles and Patterns of Osmoregulation and Euryhalinity in Fishes. *In*: Fish Physiology: Euryhaline Fishes. p. 558.
- Engelhardt, F.R.; Wong, M.P. & Duey, M.E. 1981. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water, as affected by petroleum exposure, *Aquatic Toxicology*, 1(3-4): 175-186.
- Evans, D.H.; Claiborne, J.B.; Farmer, L.; Mallery, C. & Krasny, E.J. 1982. Fish gill ionic transport: methods and models. *The Biological Bulletin* , 163(1): 108-130.
- Evans, H.D.; Piermarini, M.P. & Choe, K.P. 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological reviews*, 85(1): 97-177.
- Fanta, E.; Luvizotto, M.F. & Meyer, A.P. 1995. Gill structure of the Antarctic fishes *Notothenia (Gobionotothen) gibberifrons* and *Trematomus newnesi*, Nototheniidae stressed by salinity changes and some behavioral consequences. *Nankyoku Shirio* (Antartic Record), 39(1): 25-39.
- Fishbase. Disponível em: < <http://www.fishbase.org>>. Acessado em: 17 jan 2022
- Frick, N.T. & Wright. P.A. 2002. Nitrogen metabolism and excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus*. The influence of environmental salinity and external ammonia. *Journal of experimental biology*, 205(1) 91-100.
- Franz, R. & Burgess , G.H. 1983. *Limia rivasi* Franz and Burgess. Cap. 41. *In*: Lee, D.S.; Platania, S.P. & Burgess, G.H. (Eds). **Atlas of North American freshwater fishes**, supplement, North Carolina, Biological Survey Press.

- Friedlander, M.J.; Kotchabhakdi, N. & Prosser, C.L. 1976. Effects of cold and heat on behavior and cerebellar function in goldfish. *Journal of Comparative Physiology A*, 112: 19–45. <https://doi.org/10.1007/BF00612674>.
- Frisk, M.; Skov, P.V. & Steffensen, J.F. 2012. Thermal optimum for pikeperch (*Sander lucioperca*) and the use of ventilation frequency as a predictor of metabolic rate. *Aquaculture*, 324: 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.024>.
- Fry, F.E.J.; Brett, J.R. & Clawson, G.H., 1942. Lethal limits of temperature for young goldfish. *Revue Canadienne de Biologie*, 1: 50–56.
- Fry, F.E.J. 1967. Responses of vertebrate poikilotherms to temperature. 375-406p. In: Rose, A.H. (Ed.), *Thermobiology*. London, Academic Press.
- Greenpeace. The world's last intact forest landscapes. Disponível em: <<http://www.intactforests.org/>>. Acesso em: 30 jun. 2019.
- Gillooly, J.F.; Brown, J.H.; West, G.B.; Savage, V.M. & Charnov, E.L. 2002. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, 293: 2248–2251.
- Gillooly, J.F.; Charnov, E.L.; West, G.B.; Savage, V.M. & Brown, J.H. 2001. Effects of size and temperature on developmental time. *Nature*, 417: 70–73.
- Giomi, F.; Fusi, M.; Barausse, A.; Mostert, B.; Pörtner, H.O. & Cannicci, S. 2014. Improved heat tolerance in air drives the recurrent evolution of air-breathing. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1782). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2927>
- Goss, G.G.; Perry S.F.; Wood C.M. & Laurent P. 1992. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 263(2): 143-159.
- Guderley, H. 2004. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biological reviews*, 79(2): 409-427.
- Gunderson, A.R. & Stillman, J.H. 2015. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from Global Warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1808). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0401>
- Haney, D.C. & Walsh, S.J. 2003. Influence of salinity and temperature on the physiology of *Limia melanonotata* (Cyprinodontiforme: Poeciliidae): a search for abiotic factors limiting insular distribution in Hispaniola. *Caribbean Journal of Science*, 39(3): 327-337.
- Healy, T.M. & Schulte, P.M. 2012. Thermal acclimation is not necessary to maintain a wide thermal breadth of aerobic scope in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 85(2): 107-119. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0595-x>.
- Heath, A.G.; Turner, B.J. & Davis, W.P. 1993. Temperature preferences and tolerances of three fish species inhabiting hyperthermal ponds on mangrove islands. *Hydrobiologia*, 259: 47–55. <https://doi.org/10.1007/BF00005964>
- Hiatt, R.W. & Strasburg, D.W. 1960. Ecological relationships of the fish fauna on coral reefs the Marshall Islands. *Ecological Monographs*, 30(1): 65-127.
- Hoar, W.S. 1988. 4 The physiology of smolting salmonids. In *Fish physiology* (Vol. 11, pp. 275-343). Academic Press.

- Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 2002. **Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York, Oxford University Press.
- Hossain, S.; Miah, M.I.; Islam, M.S. & Shahjahan, M. 2016. Changes in hepatosomatic index and histoarchitecture of liver in common carp exposed to organophosphate insecticide sumithion. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 2(2): 164-170.
- Ip, Y.K. & Chew, S.F. 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: A review. *Frontiers in physiology*. 1. 134 doi:10.3389/fphys.2010.00134
- IPCC, 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. In: Pachauri, R.K., Reisinger, A. (Eds.), Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland, p. 104.
- IPCC, 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. In: Stocker, T.F.; Qin, D.; Plattner, G.-K.; Tignor, M.; Allen, S.K.; Boschung, J.; Nauels, A.; Xia, Y.; Bex, V. & Midgley, P.M. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. United Kingdom/New York, NY, USA, Cambridge University Press.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014, Impacts, adaptation, and vulnerability. IPCC Working Group II Contribution to AR5. Geneva: IPCC. on-line version released on 31 March at 2014.
- IPCC, 2018. Intergovernmental Panel on Climate Change. Annex I: Glossary [Matthews, J.B.R. (ed.)]. In: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.- O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.)]. In Pres. pp. 539-562.
- IPCC, 2018. Intergovernmental Panel on Climate Change. Impacts of 1.5°C Global Warming on Natural and Human Systems. In: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. Hoegh-Guldberg, O., D. Jacob, M. Taylor, M. Bindi, S. Brown, I. Camilloni, A. Diedhiou, R. Djalante, K.L. Ebi, F. Engelbrecht, J. Guiot, Y. Hijjoka, S. Mehrotra, A. Payne, S.I. Seneviratne, A. Thomas, R. Warren, and G. Zhou. pp. 177-284.
- Irvin, D.G.; Newman, K. & Hoar, W.S. 1957. Effects of dietary phospholipid and cholesterol on the temperature resistance of goldfish. *Canadian Journal of Zoology*, 35(6): 691-709. doi:10.1139/z57-059
- Jian, C.Y.; Cheng, S.Y. & Chen, J.C. 2003. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*, at different salinity and temperature levels. *Aquaculture Research*, 34(2): 175-185.
- Kellog, R.L. & Gift, J.J. 1983. Relationships between optimum temperatures for growth and preferred temperatures for the young of four fish species. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(3): 424-430.
- Kir, M. & Sunar, M.C. 2018. Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Sea Bream, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), in Relation to Salinity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(3): 516–522. <https://doi.org/10.1111/jwas.12448>

- Kır, M.; Sunar, M.C. & Gök, M.G. 2019. Acute ammonia toxicity and the interactive effects of ammonia and salinity on the standard metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 511: 734273. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734273>
- Kita, J.; Tsuchida, S. & Setoguma, T. 1996. Temperature preference and tolerance and oxygen consumption of the marbled rock-fish, *Sebastes marmoratus*. *Marine Biology*, 125(3): 467-471.
- Kröncke. 1998. Macrofauna communities in the Amundsen Basin, at the Morris Jesup Rise and at the Yermak Plateau (Eurasian Arctic Ocean). *Polar Biology*, 19(6): 383-392.
- Kumlu, M.; Kumlu, M. & Turkmen, S. 2010. Combined effects of temperature and salinity on critical thermal minima of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Journal of Thermal Biology*, 35: 302-304.
- Kutty, M.N. 1968. Respiratory quotient in goldfish and rainbow trout. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 25(8): 1689-1728.
- Kutty, M.N. 1981. Energy metabolism in mullet. 219-253p. In: Oren, O.H. (Ed.), **Aquaculture of Grey Mullet**. London, Cambridge University Press.
- Lalli, C.M. & Parsons, T.R. 1997. **Biological Oceanography: An Introduction**. Oxford, UK, Butterworth-Heinemann Ltd, 2 Ed.
- Lowe, C.H. & Heath, W.G. 1969. Behavioral and physiological responses to temperature in the desert pupfish *Cyprinodon macularius*. *Physiological Zoology*, 42(1): 53-59.
- Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75: 1561-1574. <https://doi.org/10.1139/z97-783>.
- Machado, M.R. 1999. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Journal of Health Sciences*, 1(1): 63-76.
- Madeira, D.; Narciso, L.; Cabral, H. & Vinagre, C. 2012. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *Journal of Sea Research*, 70: 32-41.
- Madeira, D.; Narciso, L.; Cabral, H.N.; Vinagre, C. & Diniz, M.S. 2012. HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. *Journal of sea research*, 73: 137-147.
- Maltchik, L.; Esteban, L.; Lanés, K.; Stenert, C. & Medeiros, E.S.F. 2010. Species-area relationship and environmental predictors of fish communities in coastal freshwater wetlands of southern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 88: 25-35. doi:10.1007/s10641-010-9614-0.
- Manush, S.M.; Pal, A.K.; Chatterjee, N.; Das, T. & Mukherjee, S.C. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Macrobrachium rosenbergii* acclimated to three temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 29: 15-19.
- Mariano, W.D.S.; Oba, E.T.; Santos, L.R.B.D. & Fernandes, M.N. 2009. Respostas fisiológicas de jeju ("Hoplerythrinus unitaeniatus") expostos ao ar atmosférico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10(1): 210-223
- Marshall, W.S.; Bryson, S.E. & Luby, T. 2000. Control of epithelial Cl⁻ secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Journal of experimental biology*, 203(12): 1897-1905.

- Mccormick, S.D.; Regish, M. & Christensen, K. 2009. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *The Journal of Experimental Biology*, 212(24): 3994-4001.
- McKenzie, D.J.; Piraccini, G.; Felskie, A.; Romano, P.; Bronzi, P. & Bolis, C.L. 1999. Effects of plasma total ammonia content and pH on urea excretion in Nile tilapia. *Physiological and biochemical zoology*, 72(1): 116-125.
- Meffe, G.K.; Weeks, S.C.; Mulvey, M. & Kandl, K.L. 1995. Genetic differences in thermal tolerance of eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*; Poeciliidae) from ambient and thermal ponds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(12): 2704–2711.
- Mega, D.F. & Bemvenuti, M.A. 2006. Guia didático sobre alguns peixes da Lagoa Mangueira, RS. *Cadernos de Ecologia Aquática*, 1(2): 1-15.
- Mora, C. & Ospina, A. 2001. Tolerance to high temperatures and potential impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). *Marine Biology*, 139(4): 765-769.
- Morgan, R.; Finnoen, M.H.; Jensen, H.; Pelabon, C. & Jutfelt, F. 2020. Low potential for evolutionary rescue from climate change in tropical fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(52): 33365–33372.
- Neill, W.H. & Magnuson, J.J. 1974. Distributional ecology and behavioral thermoregulation of fishes in relation to heated effluent from a power plant at Lake Monona, Wisconsin. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103: 663–710.
- Neill, W.H.; Magnuson, J.J. & Chipman, G. 1972. Behavioral thermoregulation by fishes: a new experimental approach. *Science*, 176: 1443–1445.
- Nelson, J.S. 1984. **Fishes of the world**. 2 Ed. New York, Wiley-Interscience.
- Otto, R.G. 1973. Temperature tolerance of the mosquitofish, *Gambusia affinis* (Baird and Baird). *Journal of Fish Biology*, 5: 575-585.
- Pérez, E.; Díaz, F. Espina, S. 2003. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces: Cichlidae). *Journal of Thermal Biology*, 28: 531-537.
- Perry, A.L.; Low, P.J.; Ellis, J.R. & Reynolds, J.D. 2005. Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*, 308: 1902–1905.
- Piermarini, P.M., Evans, D.H., 2000. Effects of environmental salinity on Na(+)/K (+)- ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *J. Exp. Biol.* 203: 2957–2966.
- Pinsky, M.L.; Eikeset, A.M.; McCauley, D.J.; Payne, J.L. & Sunday, J.M. 2019. Greater vulnerability to warming of marine versus terrestrial ectotherms. *Nature*, 569(7754): 108–111. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1132-4>
- Pörtner, H.O. 2001. Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88: 137–146.
- Pörtner, H.O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 132: 739-761.
- Pörtner, H.O. 2004. Climate variability and the energetic pathways of evolution: the origin of endothermy

- in mammals and birds. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77: 959- 981.
- Pörtner, H.O.; Langebuch, M. & Reipschläger, A. 2004. Biological impact of elevated ocean CO₂ concentration: lessons from animal physiology and Earth history. *Journal of Oceanography*, 60: 705-718.
- Pörtner, H.O. & R. Knust. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315: 95–97. <https://doi.org/10.1126/science.1135471>.
- Pörtner, H.O. & Farrell, A.P. 2008. Physiology and climate change. *Science*, 322(5902): 690–692. <https://doi.org/10.1126/science.1163156>.
- Pörtner, H.O. & Lannig G. 2009. Oxygen and Capacity Limited Thermal Tolerance. 147-191. In: Jeffrey G. Richards, Anthony P. Farrell, & Colin J. Brauner (Eds.). **Fish Physiology**, Burlington: Academic Press.
- Pörtner, H.O. 2010. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 213: 881-893.
- Pörtner, H.O.; Schulte, P.M.; Wood, C.M. & Schiemer, F. 2010. Niche dimensions in fishes: An integrative view. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(5): 808–826. <https://doi.org/10.1086/655977>
- Prodócimo, V. & Freire, C. 2006. The Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter of estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) in hypo and hyper regulation of plasma osmolality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, C, 142: 347- 355.
- Prosser, C.L. & Heath, J.E. 1991 Temperature. 109-165. In: Prosser, C.L. (ed). **Environmental and metabolic animal physiology**. New York, Wiley-Liss.
- Randall, D.J.; Baumgarten, D. & Malyusz, M. 1972. The relationship between gas and ion transfer across the gills of fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 41(3): 629-637.
- Reyes, I.; Díaz F.; Re, A.D.; Pérez, J. 2011. Behavioral thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 36(3): 200-205.
- Rezende, E. L.; Castañeda, L. E.; Santos, M. 2014. Tolerance landscapes in thermal ecology. *Functional Ecology*, 28: 799–809.
- Rivas, L.R. & Fink, W.L. 1970. A new species of poeciliid fish of the genus *Limia* from the island of Grand Cayman, B.W.I. *Copeia*, 1970: 270-274.
- Rosa, R.; Rummer, J.L.; Munday, P.L. 2017. Biological responses of sharks to ocean acidification. *Biology letters*. 13(3): 20160796. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2016.0796>
- Rozin, P.N.; Mayer, J. 1961. Thermal reinforcement and thermoregulatory behavior in the goldfish, *Carassius auratus*. *Science*, 134: 942–943.
- Sarma, K.; Pal, A.K., Ayyappan, S.; Das, T.; Manush, S.M.; Debnath, D. & Baruah, K. 2010. Acclimation of *Anabas testudineus* (Bloch) to three test temperatures influences thermal tolerance and oxygen consumption. *Fish physiology and biochemistry*, 36(1): 85-90.
- Schimidt-Nielsen, K. 1999. Cap.9, 353-392. In: **Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente**. São Paulo, Santos Livraria e Editora.

- Schmidt-Nielsen, K. 2002. **Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente**. 5ª Ed. São Paulo, Santos Livraria e Editora.
- Schulte, P.M. 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, 218(12): 1856–1866. <https://doi.org/10.1242/jeb.118851>
- Seebacher, F.; White, C.R. & Franklin, C.E. 2015. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change*, 5(1): 61–66. <https://doi.org/10.1038/nclimate2457>
- Shaw, R.B. & B.L. Bercaw. 1962. Temperature and life-span in poikilothermous animals. *Nature*, 196: 454–457.
- Sharmin, S.; Shahjahan, M.; Hossain, M.A.; Haque, M.A. & Rashid, H., 2015. Histopathological changes in liver and kidney of common carp exposed to sub-lethal doses of malathion. *Pakistan Journal of Zoology*, 47: 1495–1498.
- Shrimpton, J. M.; Patterson, D.A.; Richards, J.G.; Cooke, S.J.; Schulte, P.M.; Hinch, S.G. & Farrell, A.P. 2005. Ionoregulatory changes in different populations of maturing sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* during ocean and river migration. *Journal of Experimental Biology*, 208(21): 4069–4078.
- Sgrò, C.M.; Terblanche, J.S. & Hoffmann, A.A. 2016. What can plasticity contribute to insect responses to climate change? *Annual Review of Entomology*, 61: 433–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023859>
- Slovan, K. A.; Wood C.M.; Scott G.R.; Wood S.; Kajimura M.; Johannsson O.E.; Almeida-Val V.M.F. & Val A.L. 2006. Tribute to RG Boutilier: the effect of size on the physiological and behavioral responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 209: 1197–1205.
- Somero, G.N. 2010. The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *Journal of Experimental Biology*, 213: 912–920.
- Somero, G.N. 2011. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *American Journal of Physiology -Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 30 (1): R1–R14.
- Southward, A.J.; Hawkins, S.J. & Burrows, M.T. 1995. Seventy years’ observations of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the western English Channel in relation to rising sea temperature. *Journal of Thermal Biology*, 20: 127- 155.
- Stillman, J.H. 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science*, 301: 65. <http://www.jstor.org/stable/3834630>
- Sunday, J.M.; Bates, A.E. & Dulvy, N.K. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1713): 1823–1830. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1295>
- Tewksbury, J.J.; Huey, R.B.; Deutsch, C.A. 2008. Putting the heat on tropical animals. *Science*, 320: 1296–1297.
- Tipsmark, C.K.; Madsen, S.S.; Seidelin, M.; Christensen, A.S.; Cutler, C.P. & Cramb, G. 2002. Dynamics of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter and Na⁺, K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental*

Zoology, 293(2): 106-118.

- Tomanek, L. & Somero, G.N. 1999. Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (*genus Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *Journal of Experimental Biology*, 202(21): 2925-2936.
- Tomanek, L. & Somero, G.N. 2002. Interspecific and acclimation induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (*genus Tegula*): implications for regulation of hsp gene expression. *Journal of Experimental Biology*, 205(5): 677-685.
- Tomanek, L. 2005. Two-dimensional gel analysis of the heat-shock response in marine snails (*genus Tegula*): interspecific variation in protein expression and acclimation ability. *Journal of Experimental Biology*, 208: 3133–3143.
- Tomanek, L. 2008. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81:709–717.
- Tomanek, L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, 213: 971-979.
- Tucker, J.W. 1998. **Marine fish aquaculture**, 1st Ed. Boston, USA, Springer.
- Tsuchida, S. 1995. The relationship between upper temperature tolerance and final preferendum of Japanese marine fish. *Journal of Thermal Biology*, 20: 35–41.
- Urban, M.C. 2015. Accelerating extinction risk from climate change. *Science*, 348(6234): 571–573. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4984>
- Verdouw, H.; Van Echteld, C.J.A. & Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12: 399–402. doi:10.1016/0043-1354(78)90107-0
- Vinagre, C.; Leal, I.; Mendonça, V. & Flores, A.A.V. 2015. Effect of warming rate on the critical thermal maxima of crabs, shrimp and fish. *Journal of Thermal Biology*, 47:19–25.
- Vinagre, C.; Leal, I.; Mendonca, V.; Madeira, D.; Narciso, L. & Diniz, M. 2016. Vulnerability to climate warming and acclimation capacity of tropical and temperate coastal organisms. *Ecological indicators*, 62: 317–327. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.11.010
- Walsh, S.J.; Haney, D.C.; Timmerman, C.M. & Dorazio, R.M. 1998. Physiological tolerances of juvenile robust redbreast, *Moxostoma robustum*: conservation implications for an imperiled species. *Environmental Biology of Fishes*, 51: 429–444.
- Webb, B.W.; Hannah, D.M.; Moore, R.D.; Brown, L.E. & Nobilis, F. 2008. Recent advances in river and stream temperature. *Hydrological Processes*. 22: 912-918.
- Wedemeyer, G.A. 1996. **Physiology of fish in intensive culture systems**. New York , Chapman & Hall.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 591-625.
- Wetzel, R.G. 2001. **Limnology**: lake and river ecosystems. San Diego, Elsevier Academic Press. 1006 p

- Winkaler, E.U.; das Graças Silva, A.; Galindo, H.C. & dos Reis Martinez, C.B. 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 23: 507-514.
- Willmer, P.; Graham, S. & Johnston, I. 2005. Environmental physiology of animals. 2nd edition, Blackwell Publishing. P. 179-215.
- Wilson, J.M.; Leitão, A.; Gonçalves, A.F.; Ferreira, C.; Reis-Santos, P.; Fonseca, A.V. & Coimbra, J. 2007. Modulation of branchial ion transport protein expression by salinity in glass eels (*Anguilla anguilla* L. *Marine biology*, 151(5): 1633-1645.
- Wolff, L.L.; Hreciuk, E.R.; Viana, D.; Zaleskii, T. & Donatti, L. 2007. Population structure of *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) collected in a brook in Guarapuava, PR. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3): 417-423. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000300008>.
- Wood, C.M. 2001. Influence of feeding, exercise, and temperature on nitrogen metabolism and excretion. Vol. 20: 201-238. In: Wright, P.A. & Anderson, P.M.(Eds.). **Nitrogen Excretion, Fish Physiology**. New York, Academic Press.
- Wood, C.M.; Brix, K.V.; De Boeck, G.; Bergman, H.L.; Bianchini, A.; Bianchini, L.F.; Maina, J.N.; Johannsson, O.E.; Kavembe, G.D.; Papah, M.B.; Letura, K.M. & Ojoo, R.O. 2016. Mammalian metabolic rates in the hottest fish on earth. *Scientific reports*. 6: 26990. <https://doi.org/10.1038/srep26990>.
- Wright, P.A. & Wood C.M. 2012. Seven things fish know about ammonia and we don't. *Respiratory physiology & neurobiology*, 184: 231-240.
- Zall, D.M.; Fisher, D. & Garner, M.Q. 1956. Photometric determination of chlorides in water. *Analytical Chemistry*, 28: 1665-1668. doi:10.1021/ac60119a009
- Zavala-Camin, L.A. 1996. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. Maringá, EDUEM.

ANEXOS

Anexo I Tabela 1. Parâmetros do local da coleta de *Phalloceros caudimaculatus* média de peso (0,670± 0,119 g).

Ilha Comprida									
17/09/2020 final do inverno									
1ª coleta		O ₂ g/l(ppm)	O ₂ %	condutividade (EC)	pH	Temperatura do O ₂	Temperatura do pH	Salinidade	Absorbância
ponto 1	Superfície	*	*	*	7,61	*	26,4	10 11	*
Praia	Fundo	*	*	*		*		*	*
Médias					7,61		26,4		
ponto 2	Superfície	*	*	*	7,61	*	25,9	10 11	*
	Fundo	*	*	*		*		*	*
Médias					7,61		25,9		
03/07/2021 inverno									
2ª coleta		O ₂ g/l(ppm)	O ₂ %	condutividade (EC)	pH	Temperatura do O ₂	Temperatura do pH	Salinidade	Absorbância
ponto 1	Superfície	7,4	80,5	16,28	7,04	18,2	17,4	10	0,4060
poça de maré	Fundo	9,7		20,6	7,36	20,3	20,9	10	0,4165
Médias		8,55	8,55	18,44	7,2	19,25	19,15	10	0,4112
28/09/2021 primavera									
3ª coleta		O ₂ g/l(ppm)	O ₂ %	condutividade (EC)	pH	Temperatura do O ₂	Temperatura do pH	Salinidade	Absorbância
ponto 1	Superfície	6,5	83,5	40,6	7,5	30,7	30,4	22	*
poça de maré	Fundo	7,7	*	40,5	7,66	30,4	30,1	21-22	*
Médias		7,1	83,5	40,55	7,58	30,55	30,25		
28/09/2021 primavera									
3ª coleta		O ₂ g/l(ppm)	O ₂ %	condutividade (EC)	pH	Temperatura do O ₂	Temperatura do pH	Salinidade	Absorbância
ponto 2	Superfície	4,8	60	21,9	6,8	25,5	25,8	10	*
Praia	Fundo	1,6	20	40	7,3	24,9	24,9	20	*
Médias		3,2	40	30,95	7,05	25,2	25,35	15	

Anexo II

Tabela 2. Características físicas-químicas da água medida ao longo do período experimental (CTMáx) de *Phalloceros caudimaculatus*.

Parâmetros físicos-químicos		20°C	25°C	30°C
salinidade (6 ‰)	pH	7,4	7,3	7,6
	Temperatura °C	20,5	25,1	29,2
	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	O2 acima de 5‰	O2 acima de 5‰	O2 acima de 5‰
salinidade (11 ‰)	pH	7,5	7,5	7,5
	Temperatura °C	20,5	24,7	29,1
	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	O2 acima de 5‰	O2 acima de 5‰	O2 acima de 5‰

Anexo III

Tabela 3.

Tolerância termal (CTM_{ax})-(20°C, 25°C e 30°C), Capacidade de aclimação térmica (CAT) (Acclimation response ratio_ARR) - (20°C, 25°C e 30°C) salinidade (6 e 11 ‰), Taxas de Consumo de Oxigênio (VO_2), excreção de amônia (J_{amm_N}), fluxo líquido de cloreto (J_{net}^{Cl}) e de sódio (J_{net}^{Na}) de *Phalloceros caudimaculatus* aclimatados por uma semana em diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) em salinidades (6 ‰).

Temperatura de aclimação (°C)	Parâmetros					
	20°C	EP	25°C	EP	30°C	EP
CTM _{ax} 6‰	38,567 ± 0,231	A	39,833 ± 0,117	B	41,752 ± 0,155	C
CTM _{ax} 11‰	39,138 ± 0,172	a*	39,983 ± 0,060	b	41,057 ± 0,121	c*
(CAT) 6‰	18,567 ± 0,207	A	14,833 ± 0,111	B	11,756 ± 0,194	C
(CAT) 11‰	19,137 ± 0,172	a	14,983 ± 0,06	b	11,057 ± 0,121	c
(VO_2 mg O ₂ ⁻¹ kg ⁻¹ h) 6‰	263,497 ± 43,338		217,892 ± 61,594		287,803 ± 28,248	
Excreção de Amônia (J_{amm_N})	-1,678 ± 0,351	A	-3,32 ± 0,823	A	-5,861 ± 0,866	B
Fluxo líquido de cloreto (J_{net}^{Cl})	-7,843 ± 3,384		-5,323 ± 3,451		-13,445 ± 3,619	
Fluxo líquido de sódio (J_{net}^{Na})	-5,593 ± 8,768	A	-48,607 ± 10,05	B	-15,326 ± 6,798	A

Letras diferentes (A, a, B, b, C, c) mostram as diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) das diferentes temperaturas de aclimação.

Asteriscos (*) representam diferenças entre as duas salinidades testadas, em uma mesma temperatura de aclimação.

Média estão expressas em (MÉDIA ± S.E.M.)

Anexo IV

Tabela 4.

Os valores médios de temperatura (°C) e pH de *P. caudimaculatus* na primeira e segunda série experimental nas temperaturas de aclimação 20, 25, 30°C na CTMáx, em duas salinidades (6‰) e (11‰).

Os valores médios do peso (g) de *P. caudimaculatus* na série experimental consumo de oxigênio em 20,25, 30°C e salinidade 6‰.

Temperatura de aclimação (°C)	Parâmetros					
	20°C	EP	25°C	EP	30°C	EP
CTMáx 6‰	20,486 ± 0,0884		25,086 ± 0,139		29,229± ± 0,158	
CTMáx 11‰	20,500 ± 0,0488		24,743 ± 0,129		29,057± ± 0,166	
pH 6‰	7,374 ± 0,148		7,348 ± 0,0871		7,587± ± 0,0312	
pH 11‰	7,500 ± 0,000		7,500 ± 0,000		7,500 ± 0,000	
Peso (g) 6‰	0,263 ± 0,036		0,256± ± 0,0249		0,263 ± 0,0302	

Média estão expressas em (MÉDIA ± S.E.M.)

Anexo V

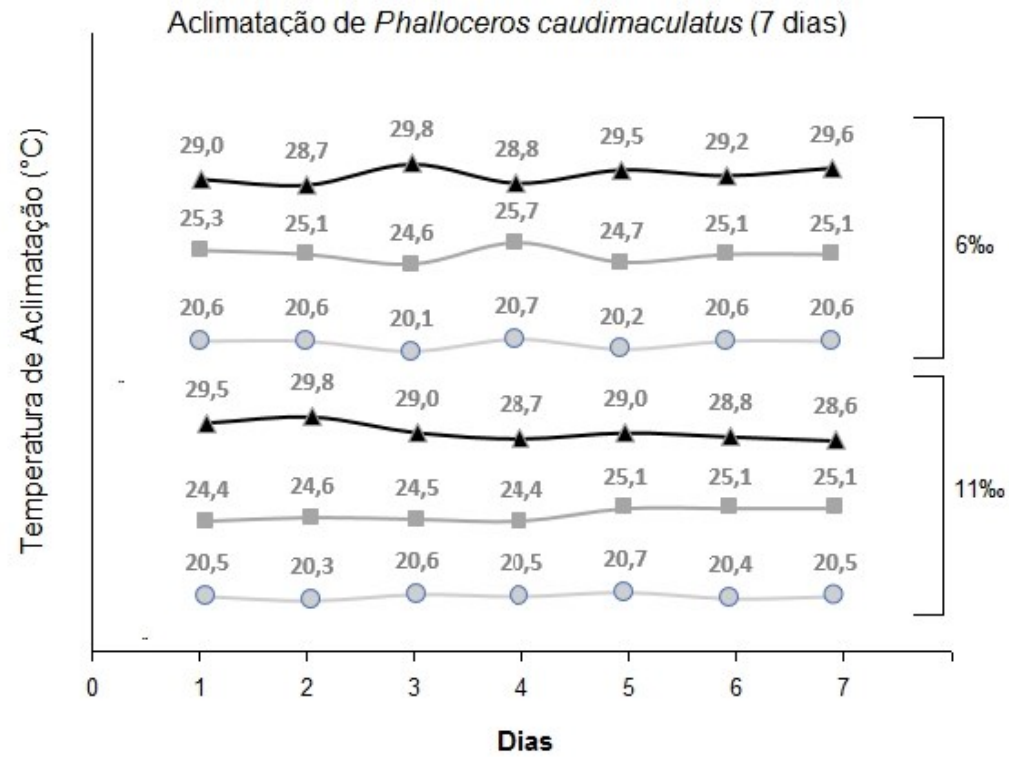


Fig.1. Variação na temperatura de aclimatação de *Phalloceros caudimaculatus* por 7 dias as temperaturas de 20, 25, 30°C, nas salinidades de (6‰) e (11‰)