Capítulo 6

Toxicidade e Efeitos da Amônia em Peixes Neotropicais

Cláudia Bueno dos Reis Martinez; Fábio Azevedo; Elissandra Ulbricht Winkaler

Departamento de Ciências Fisiológicas; Universidade Estadual de Londrina
C.P. 6001; 86051-990 – Londrina – PR <cbueno@uel.br>

Resumo

A amônia é um dos fatores limitantes na piscicultura, visto que esse resíduo nitrogenado pode atingir rapidamente concentrações tóxicas em sistemas intensivos, causando redução da sobrevivência, do crescimento e até mesmo a morte dos peixes. Entretanto, estudos sobre a toxicidade da amônia para espécies de peixes dulcícolas neotropicais ainda são bastante escassos. Assim, a maior ênfase deste capítulo está dirigida para os resultados que têm sido obtidos com testes de toxicidade aguda com amônia com três espécies de peixes neotropicais dulcícolas: *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Prochilodus lineatus* (curimba) e *Astyanax altiparanae* (lambari do rabo amarelo). Testes de exposição aguda (24 h) à amônia mostram que as três espécies são muito mais sensíveis à amônia do que, por exemplo, a tilápia do Nilo e o bagre do canal, indicando assim que concentrações de amônia aparentemente seguras para espécies exóticas podem ser letais para espécies neotropicais e que estas diferenças devem ser consideradas no estabelecimento de critérios para a qualidade da água e bem estar animal. Além disso, quando expostas a concentrações subletais de amônia durante 24 horas, as espécies nativas apresentaram alterações significativas nos valores de hematócrito, concentrações plasmáticas de sódio e glicose, bem como alterações histológicas nas brânquias. Concentrações de amônia não ionizada na ordem de 0,16 mg L^{-1} podem afetar o estado de saúde geral destas espécies de peixe e interferir no seu crescimento e reprodução, contribuindo dessa forma para o insucesso do sistema de produção.
Palavras-chave: amônia, glicemia, hematócrito, histopatologia branquial, sódio plasmático, toxicidade

Ammonia Toxicity and Effects in Neotropical Fish

Abstract

Ammonia is one of the main limiting factors in intensive fish farming. This nitrogenous waste can rapidly reach toxic concentrations and cause reduced survival and growing rates, and mortality of fish. However studies concerning ammonia toxicity to Neotropical fish are still scarce. Therefore this chapter focus on ammonia acute toxicity tests (24h) with three freshwater native fish species: *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Prochilodus lineatus* (curimba) and *Astyanax altiparanae* (lambari do rabo amarelo). Neotropical fishes are less resistant to ammonia than, for instance, Nile tilapia and channel catfish, and ammonia concentrations which are apparently safe to exotic fish species might be lethal to native fish. This difference should be considered for the definition of standard criteria for water quality and animal welfare. When the native species were exposed during 24 hours to sublethal ammonia concentration, they presented significant changes in hematocrit, sodium and glucose plasma concentrations, as well as gill histopathological

alterations. Un-ionized ammonia concentrations as low as 0.16 mg L^{-1} might affect general health of Neotropical fish and thus interfere in their growth rate and reproduction, preventing a successful aquaculture.
Key words: ammonia, blood glucose, hematocrit, gill histopathology, plasma sodium, toxicity.

1. Introdução

O sucesso da piscicultura está diretamente relacionado com as condições físicas e químicas do solo e da água onde ela está instalada (Urbinati e Carneiro, 2004). Vários fatores determinam a qualidade da água de um viveiro. Dentre os principais fatores a serem monitorados e compreendidos estão: temperatura, oxigênio dissolvido, transparência, pH, alcalinidade, dureza e concentração de resíduos metabólicos, principalmente amônia e nitrito, assim como de outras substâncias nocivas, como poluentes em geral.

Os peixes confinados normalmente recebem alimento com altos níveis de proteínas. Parte dessas proteínas é assimilada pelo animal e convertida em proteína animal. O restante é eliminado, e o nitrogênio contido nestes resíduos pode ser excretado como nitrogênio orgânico na forma de fezes ou como amônia, que é a principal forma de excreção de nitrogênio dos peixes. O nitrogênio também pode aumentar em viveiros de peixes em virtude da adição de fertilizantes, como o sulfato de amônio, e adubos orgânicos, como também em razão da decomposição do alimento não consumido (Baldisseroto, 2002). Em sistemas produção em regime intensivo, ocorre a produção contínua de resíduos nitrogenados em níveis que dependem da dieta utilizada, dos procedimentos de alimentação e das condições gerais de criação. Em sistemas com recirculação de água esses resíduos nitrogenados, especialmente amônia e nitrito, podem atingir níveis bastante elevados que atuam como um fator limitante para o crescimento ou sobrevivência do peixe (Person-Le Ruyet et al., 1995; 1998). Assim, os níveis de resíduos nitrogenados devem ser controlados nos sistemas produção dentro de limites seguros, de acordo com a sensibilidade das espécies de peixes.

Uma vez no ambiente aquático a amônia é oxidada, por bactérias do gênero *Nitrosomonas*, em nitrito (NO_2^-):

$$NH_4^+ + 1\ ½\ O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H + H_2O$$

O nitrito, produto desta reação, irá sofrer então uma oxidação por ação de bactérias do gênero *Nitrobacter*, sendo transformado em nitrato (NO_3^-), como segue:

$$NO_2^- + ½\ O_2 \rightarrow NO_3^-$$

Ambos os processos acima ocorrem em condições aeróbicas e são conhecidos como nitrificação. Já a redução do nitrito para amônia é conhecida como desnitrificação e se realiza em condições anaeróbicas, próprias de ambientes eutrofizados, em que ocorre a decomposição da matéria orgânica (Arana, 1997).

A amônia e o nitrito são tóxicos para os peixes, mesmo em baixas concentrações, enquanto o nitrato só se torna tóxico em altas concentrações (Baldisseroto, 2002), como no caso de sistemas de recirculação de água (sistemas fechados) nos quais altos níveis de nitrato podem ser alcançados como resultado da nitrificação da amônia (Arana, 1997). Em sistemas com grande fluxo de água, a retirada desses compostos é efetuada rapidamente, impedindo que os níveis aumentem. Já no caso de sistemas fechados é importante a existência de filtros biológicos, com bactérias nitrificantes (Baldisseroto, 2002). Além disso, na piscicultura intensiva, o uso de rações com teores de proteína que não resultem em quantidades excessivas de resíduos nitrogenados, bem como uma densidade de peixes adequada são fatores que devem ser considerados para controlar o acúmulo desses metabólitos nitrogenados (Urbinati e Carneiro, 2004).

2. Amônia

A amônia tem recebido atenção especial como um dos fatores limitantes na criação intensiva de peixes (Tomasso, 1994). Esse resíduo nitrogenado pode atingir rapidamente concentrações tóxicas em sistemas intensivos mal manejados, causando redução da sobrevivência, do crescimento e até mesmo a morte dos animais (Urbinati e Carneiro, 2004).

Por convenção, a amônia dissolvida não ionizada é representada simplesmente como NH_3, enquanto a forma ionizada, ou íon amônio, é representada como NH_4^+. O termo amônia total refere-se à soma de ambas as formas e pode ser representado como $NH_3 + NH_4^+$. Em soluções aquosas essas duas formas de amônia estão presentes, sendo representadas pela seguinte equação de equilíbrio (Emerson et al., 1975):

$$NH_3 + nH_2O \leftrightarrow NH_4^+ + OH^- + (n\text{-}1)\ H_2O$$

As proporções relativas de NH_3 e NH_4^+ presentes em uma solução dependem principalmente da temperatura e do pH e, em menor extensão, da salinidade. A concentração relativa de NH_3 aumenta com o aumento da temperatura e do pH e diminui com o aumento da salinidade (Bower e Bidwell, 1978). Em criações comerciais a alimentação é a maior fonte de amônia e sua toxicidade é maior do meio para o final da tarde, quando o pH e a temperatura atingem seus valores máximos, e a concentração de gás carbônico seus valores mínimos. Nestas condições, a amônia não ionizada atinge seus níveis mais críticos no tanque (Boyd, 1990).

Os efeitos tóxicos da amônia presente na água para os peixes estão relacionados principalmente à forma não ionizada (NH_3), devido à facilidade com que esta molécula se difunde para dentro do peixe (Hillaby e Randall, 1979). A grande maioria das membranas biológicas é permeável a essa forma de amônia, mas relativamente impermeável ao íon amônio (NH_4^+). A amônia não ionizada é de natureza lipofílica e por isso difunde-se rapidamente através das membranas biológicas, enquanto a amônia ionizada ocorre como moléculas maiores, hidratadas e carregadas, que não podem atravessar prontamente as membranas (Randall e Tsui, 2002). Aumento na

concentração externa de amônia não ionizada resulta em aumento na taxa de difusão, causando um acréscimo na quantidade interna da molécula, que leva a um restabelecimento do equilíbrio NH_3 – NH_4^+ dentro do peixe. Com a conversão da "nova" amônia não ionizada (NH_3) para a forma ionizada (NH_4^+), mais NH_3 externa se difunde para o interior do animal (Tomasso, 1980) Assim, qualquer pequeno aumento na concentração externa de NH_3 pode causar um grande aumento na concentração interna de amônia total, excedendo as concentrações toleradas pelo organismo (Das et al., 2004).

A amônia constitui o principal produto para a excreção de nitrogênio em peixes teleósteos e é produzida a partir do catabolismo de proteínas da dieta, principalmente no fígado. Após sua produção ela deve ser prontamente eliminada do corpo porque pode se tornar tóxica se for acumulada no organismo. Ela é eliminada através das brânquias, sendo que o rim colabora com menos de 2% da excreção de amônia total pelos teleósteos (Hillaby e Randall, 1979; Randall e Wright, 1987). Evidências experimentais indicam a existência de pelo menos três mecanismos em potencial para a extrusão de amônia através das brânquias dos peixes: difusão passiva de NH_3 a favor de um gradiente químico, difusão passiva de NH_4^+ a favor de um gradiente eletroquímico, e um trocador eletroneutro Na^+/ NH_4^+, localizado na membrana apical. A difusão passiva de NH_4^+ tem importância em termos quantitativos apenas para teleósteos marinhos, nos quais a permeabilidade iônica branquial é elevada. Para os teleósteos dulcícolas a excreção de amônia pelas brânquias é dominada pela via associada à difusão de NH_3 sendo o papel do trocador Na^+/NH_4^+ menos relevante (Wilson, 1996).

2. 1. Toxicidade da amônia para peixes

A toxicidade é uma propriedade relativa de uma substância, que se refere ao seu potencial em afetar nocivamente um organismo vivo, e depende da concentração do agente químico e da duração da exposição. Para se determinar a toxicidade relativa de uma substância a um organismo aquático é feito um teste de toxicidade aguda para se estimar a concentração letal média (CL_{50}) da substância na água onde os organismos estão expostos. A CL_{50} é a concentração estimada que produz mortalidade em 50% da população-teste, em um período de tempo específico, geralmente de 24 a 96 horas (Martinez e Cólus, 2002).

A toxicidade da amônia para salmonídeos e outras espécies dulcícolas sob diferentes condições já foi extensamente revisada e pode variar em função da sensibilidade da espécie, estágio de desenvolvimento, duração da exposição e condições ambientais. A CL_{50} (96h) de NH_3 média para os teleósteos dulcícolas em geral é de 0,82 mg L^{-1} de NH_3 (Person-Le Ruyet et al., 1995).

O motivo de estudos sobre a toxicidade da amônia para espécies de peixes dulcícolas neotropicais serem ainda bastante escassos é devido, em parte, ao fato de a piscicultura de água doce ser uma atividade relativamente recente no Brasil, com a maior parte da produção nacional sendo representada ainda por espécies exóticas, tais como as carpas e a tilápia do Nilo (Fracalossi et al., 2004). Para se viabilizar a produção de espécies nativas em larga escala alguns estudos têm sido conduzidos com determinadas espécies, revelando para algumas delas uma grande potencialidade para a piscicultura nacional. Entretanto, para garantir o sucesso na produção de espécies

nativas é de fundamental importância que se conheça a sensibilidade de tais espécies aos parâmetros de qualidade de água, como os resíduos nitrogenados, uma vez que estes constituem fatores limitantes para a sobrevivência e crescimento dos peixes em confinamento. Assim, ênfase será dada aos resultados de testes de toxicidade aguda da amônia para três espécies de peixes neotropicais dulcícolas: *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Prochilodus lineatus* (curimba) e *Astyanax altiparanae* (lambari do rabo amarelo). Os espécimes utilizados nos testes foram obtidos em uma estação de piscicultura e os testes foram conduzidos em pH 8,5 e temperatura de 22ºC, o que equivale a uma concentração de NH_3 correspondente a 12,7% da concentração de amônia total (Arana, 1997).

O pacu é uma espécie autóctone, originária da Bacia do Prata, que tem se mostrado interessante para a prática da piscicultura devido ao seu potencial em termos de manejo rústico, boas taxas de crescimento e aceitação no mercado consumidor (Assis et al., 2004; Jomori et al., 2005). Além disso, essa espécie tem excelentes atributos para lidar com restrições devido a seu hábito alimentar herbívoro/onívoro (Dal Pai, 2000) e sua tolerância a baixas temperaturas, o que permite que ela seja criada numa ampla faixa de latitudes (Bechara et al., 2005). A segunda espécie estudada, o curimba, é considerada uma das mais importantes e abundantes das regiões Sudeste e Sul do Brasil, onde é muito utilizada na alimentação humana. Caracteriza-se como uma espécie detritívora de grande porte, podendo chegar até 6 kg, rústica e de alta fecundidade (Leonhardt et al., 2002). Por pertencer a um baixo nível trófico e ser bem aceito pelos consumidores, o curimba é considerado também um peixe com ótimo potencial para piscicultura nas regiões tropicais e subtropicais (Leonhardt et al., 2002) e tem sido amplamente utilizado na piscicultura brasileira (Zaniboni-Filho et al, 2002). Apesar de não ser uma espécie de importância direta para piscicultura, o lambari do rabo amarelo é uma espécie neotropical amplamente distribuída e freqüente na bacia do rio Paraná (Garutti e Britski, 2000), onde tem grande importância na pesca recreativa e é muito utilizada na alimentação humana. Os peixes dessa espécie são de pequeno porte, atingindo em média cerca de 10 cm de comprimento padrão, apresentam grande flexibilidade alimentar, ingerindo principalmente insetos e sementes (Bennemann e Shibatta, 2002) e servem de alimento para peixes carnívoros maiores (Prioli et al., 2002).

Os testes de exposição aguda (24 h) à amônia, realizados com indivíduos jovens de pacu e curimba e adultos de lambari-do-rabo-amarelo, registraram valores de CL_{50} (24h) de NH_3 variando de 0,66 a 0,85 mg L^{-1} (Tabela 1), ou seja, próximos de 0,82 mg L^{-1}, que é o valor médio de CL_{50} (96h) de NH_3 sugerido para os teleósteos dulcícolas em geral (Person-Le Ruyet et al., 1995).

Tabela 1 – Concentração letal média (CL_{50}), 24 horas, de amônia total (NH_4^++ NH_3) e amônia não ionizada (NH_3) para três espécies de peixes neotropicais: *Astyanax altiparanae*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus*. Para cada espécie estudada é dado o valor do peso dos animais (média ± DP; n).

Espécie	CL_{50}(24h) NH_4^++ NH_3	CL_{50}(24h) NH_3
	mg L^{-1}	mg L^{-1}
Lambari do rabo amarelo (11,83 ± 1,51g; n = 36)	5,21	0,66
Pacu (22,93 ± 1,77g; n = 42)	6,68	0,85
Curimba (13,15 ± 0,80g; n = 60)	5,82	0,74

A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é considerada uma das espécies mais sensíveis à amônia, com valores de CL_{50} variando de 0,068 a 0,62 mg L^{-1} de NH_3, de acordo com o estágio de desenvolvimento (Arthur et al., 1987). Em estudo realizado por Karasu Benli e Köksal (2005), a CL_{50}(48h) de NH_3 determinada para larvas e juvenis de tilápia do Nilo foi, respectivamente de 1,01 e 7,4 mg L^{-1}. A tilápia revelou-se uma das espécies mais tolerantes à amônia, até mesmo mais tolerante que o bagre de canal, *Ictalurus punctatus*, que apresenta valores de CL_{50} para NH_3 variando entre 0,98 e 4,2 mg L^{-1} (EPA, 1999) e era, até então, considerada a espécie mais tolerante à amônia. Com base nos valores de CL_{50} registrados para as três espécies neotropicais estudadas, infere-se que estas são muito mais sensíveis à amônia do que a tilápia do Nilo e o bagre de canal. As concentrações letais estimadas para jovens curimba e pacu correspondem, respectivamente, a 10 e 11,5 % da CL_{50}(48h) estimada por Karasu Benli e Köksal (2005) para jovens de tilápia de Nilo (7,4 mg L^{-1}). Fica claro, portanto, que concentrações de amônia aparentemente seguras para espécies exóticas, como o caso da tilápia do Nilo, podem ser letais para espécies neotropicais e que estas diferenças devem ser consideradas no estabelecimento de critérios para a qualidade da água e bem estar animal.

O lambari foi a espécie que se mostrou mais sensível à amônia, apresentando o menor valor de CL_{50} (0,66 mg L^{-1}), enquanto o pacu foi a mais resistente, apresentando o maior valor de CL_{50} para a NH_3 (0,85 mg L^{-1}). Deve-se ressaltar, contudo, que as espécies testadas diferiam quanto à idade e tamanho, visto que os indivíduos lambari eram adultos, e os de pacu e curimba eram jovens. Por outro lado, os pacus jovens eram maiores que os curimbas e os lambaris (Tabela 1). Segundo Walker (1996), existem evidências que os peixes maiores são menos suscetíveis que espécimes menores. Os efeitos do tamanho podem ser resultantes dos seguintes fatores: i) indivíduos menores de uma dada espécie apresentam maior área de superfície corporal para absorção, em relação à massa corpórea; ii) indivíduos pequenos apresentam taxas respiratórias maiores.

2.2. Efeitos da amônia para peixes

A sensibilidade de muitas espécies de teleósteos dulcícolas a altas concentrações de amônia pode culminar na morte dos animais (Moraes et al., 2004). Os sintomas de intoxicação aguda pela amônia incluem hiperventilação, hiperexcitabilidade, convulsões, perda de equilíbrio, coma e morte (Twitchen e Eddy, 1994). Esta toxicidade aguda decorre principalmente de seu efeito no sistema nervoso central, mas o mecanismo de ação da amônia ainda é controverso tanto para mamíferos como para teleósteos (Person-Le Ruyet et al., 1998). Segundo Randall e Tsui (2002), a causa primária da toxidade da amônia para peixes pode decorrer do efeito despolarizante do íon NH_4^+ nos neurônios, que atua em substituição ao K^+, levando a uma ativação excessiva de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e a subseqüente morte da célula. Em salmonídeos expostos a concentrações elevadas de amônia, observam-se inicialmente alterações no sangue (aumento das concentrações plasmáticas de amônia total, glutamina e lactato) e no cérebro (decréscimo dos níveis de glutamato, açúcares e ATP). Subsequentemente todas as funções biológicas, como osmorregulação, respiração e excreção, são rapidamente alteradas (Person-Le Ruyet et al., 1998).

A determinação das concentrações letais de amônia para peixes, bem como dos efeitos das intoxicações agudas, são importantes para o estabelecimento de critérios de qualidade de água. Entretanto, ocorrências de concentrações letais de amônia em tanques e viveiros de piscicultura são raras, embora a amônia possa estar frequentemente presente em concentrações que causem efeitos subletais. A exposição de peixes a concentrações subletais de amônia induz alterações bioquímicas, fisiológicas, histológicas e comportamentais que coletivamente levam à supressão do crescimento e ao comprometimento imunológico (Hargreaves e Kucuk, 2001). Muitos parâmetros morfofuncionais são potencialmente úteis para predizer essas concentrações tóxicas limites para exposições agudas e crônicas à amônia. Os mais comumente utilizados são hematócrito, conteúdo de hemoglobina, concentrações iônicas no plasma, bem como os níveis de glicose e cortisol, a atividade de enzimas envolvidas nos processos de detoxificação e as alterações degenerativas nas brânquias.

Níveis elevados de amônia na água, correspondente a 75% da CL_{50}(24h), causaram um aumento significativo no valor do hematócrito e na concentração plasmática de sódio do lambari após 6 horas de exposição e um restabelecimento desses parâmetros a partir da 12ª hora (Figura 1). Esses aumentos transitórios podem estar relacionados com a estimulação da taxa de produção de urina, que levaria a uma diminuição do conteúdo de água do sangue produzindo hemoconcentração. Esta hipótese se sustenta nos resultados obtidos por Arillo et al. (1981) que mostraram que a atividade da renina no sangue aumenta em trutas arco-íris expostas à amônia. A renina é liberada pelo rim e cataliza a conversão de angiotensina para angiotensinogênio, no plasma. O angiotensinogênio, um potente vaso-constritor, causaria um aumento da pressão sangüínea promovendo um aumento na taxa de filtração e assim, um aumento na taxa de produção de urina (Heath, 1995).

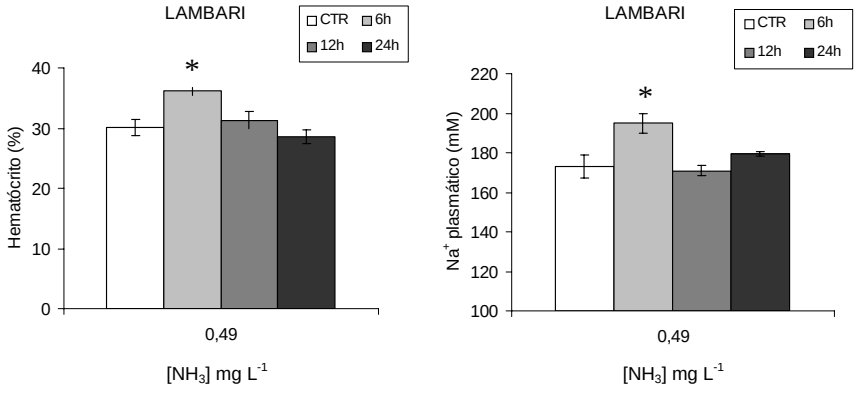

Figura 1 – Hematócrito e concentração plasmática de sódio de lambaris expostos a 0,49 mg L^{-1} de NH_3 durante 6, 12 ou 24 horas ou apenas à água (CTR). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. * indica valor significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

Por outro lado, os curimbas expostos à amônia apresentaram alterações bem distintas, tanto em relação ao hematócrito, quanto em relação ao sódio plasmático (Figura 2). Esses peixes, também expostos a uma concentração correspondente a 75% da CL_{50}(24h), apresentaram redução significativa na concentração de Na^+ após 6 e 12 horas de exposição, acompanhada de redução nos valores de hematócrito, que foi significativa apenas após 24 horas de exposição. Neste caso, os efeitos da amônia foram aparentemente opostos àqueles apresentados pelos lambaris. A redução do hematócrito e do sódio nos períodos iniciais pode ter ocorrido devido ao aumento da permeabilidade branquial à água, que levaria ao influxo osmótico de água e conseqüente hemodiluição. Este efeito da amônia, aumentando a permeabilidade branquial à água, já foi mostrado para a truta arco-íris (Smart, 1976). Entretanto, o fato da redução nos níveis de sódio ter sido significativa nos períodos iniciais pode indicar, além da hemodiluição, um efeito da amônia nos mecanismos de transporte de sódio nas brânquias. Para teleósteos dulcícolas o aumento na concentração externa de NH_4^+ interfere diretamente no balanço de Na^+, tanto pela redução da tomada de sódio, em virtude de uma inibição competitiva, como pelo aumento no efluxo deste íon, em virtude do gradiente elétrico gerado pelo aumento da concentração interna de NH_4^+ (Paley et al., 1993; Twitchen e Eddy, 1994). Ambos os efeitos podem ter resultado na redução transitória da concentração de sódio plasmático dos curimbas. Entretanto, os mecanismos compensatórios parecem ter sido suficientes para corrigir esses efeitos, visto que foi observada uma recuperação nos níveis de sódio plasmáticos após 24 horas de exposição à amônia.

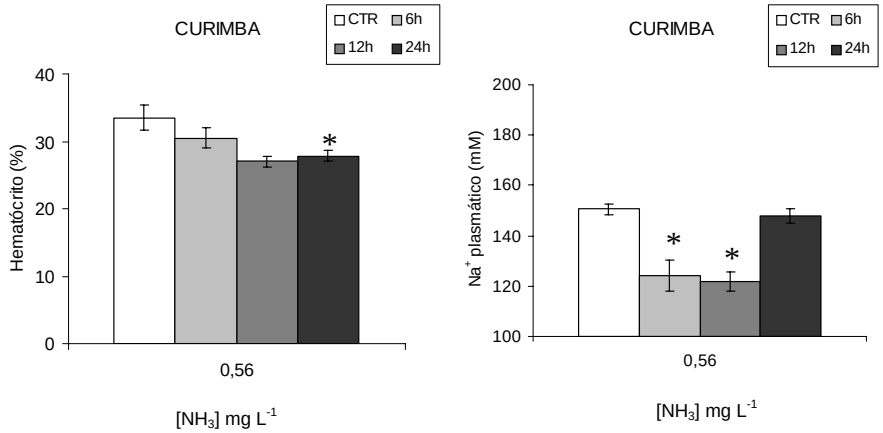

Figura 2 – Hematócrito e concentração plasmática de sódio de curimbas expostos a 0,56 mg L^{-1} de NH_3 durante 6, 12 ou 24 horas ou apenas à água (CTR). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. * indica valor significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

No que diz respeito aos efeitos da amônia no balanço de sódio e no hematócrito, o pacu foi menos sensível que as demais espécies neotropicais estudadas. Os exemplares jovens de pacu, também expostos a uma concentração de amônia correspondente a 75% da CL_{50}(24h), apresentaram apenas modestas alterações transitórias no valor de hematócrito e nenhuma alteração significativa nos níveis plasmáticos de sódio. Pode-se supor que essa menor sensibilidade estaria relacionada

com um menor acúmulo de amônia no plasma do pacu, quando comparado com o lambari e o curimba, como resultado de uma maior taxa de excreção de amônia ou menor permeabilidade branquial à NH_3. Para se entender melhor os efeitos de concentrações elevadas de amônia, bem como as respostas adaptativas apresentadas pelas espécies neotropicais, estudos futuros devem incluir a determinação da concentração de amônia no plasma dos peixes, que é um parâmetro bioquímico essencial para expressar o nível de intoxicação pela amônia.

A amônia, como um agente estressor, também pode deflagrar uma série característica de respostas endócrinas denominadas conjuntamente como resposta de estresse, análoga à "síndrome de adaptação geral" observada em mamíferos (Martinez e Cólus, 2002; Urbinatti e Carneiro, 2004). Pode-se considerar essa resposta ao estresse como um conjunto de alterações primárias, secundárias e terciárias que envolvem níveis sucessivamente superiores da organização biológica, iniciando com a ativação dos sistemas nervoso e endócrino e terminando com alterações apresentadas pelo organismo como um todo (Jobling, 1994).

Estresse em peixes, assim como em outros animais, resulta tipicamente em dois tipos de resposta endócrina: a resposta via eixo hipotálamo-hipófise e células interrenais, que culmina com o aumento do cortisol plasmático, e a resposta adrenérgica, que resulta em aumento de catecolaminas plasmáticas (Brown, 1993). A hipersecreção de catecolaminas e de corticoesteróides é considerada resposta primária ao estresse (Jobling, 1994). As catecolaminas (adrenalina e nor-adrenalina) e o cortisol disparam uma grande variedade de alterações bioquímicas e fisiológicas, denominadas coletivamente de respostas secundárias ao estresse. Os efeitos metabólicos podem incluir hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese protéica. Essa resposta endócrina generalizada, que resulta em rápida mobilização de reservas energéticas, pode ser considerada um mecanismo adaptativo que permite ao organismo um aumento na demanda energética durante a exposição a fatores estressantes (Thomas, 1990; Wendelaar Bonga, 1997).

Os exemplares adultos de lambari jovens de pacu e curimba quando expostos a duas concentrações subletais de amônia, correspondentes a 25 e 75% da CL_{50} (24h), apresentaram padrões muito distintos no que se refere à glicemia (Figura 3). Para os lambaris constatou-se uma resposta hiperglicêmica após 6 horas de exposição, que se manteve durante as 24 horas de exposição às duas concentrações de amônia testadas. Já o pacu apresentou uma resposta hiperglicêmica transitória apenas quando exposto à maior concentração de amônia, mostrando um aumento significativo da glicemia após 6 horas de exposição, seguido do retorno para os níveis basais nos intervalos subseqüentes. Diferentemente dos demais, o curimba não apresentou nenhuma alteração significativa da glicemia quando exposto às diferentes concentrações de amônia durante 24 horas.

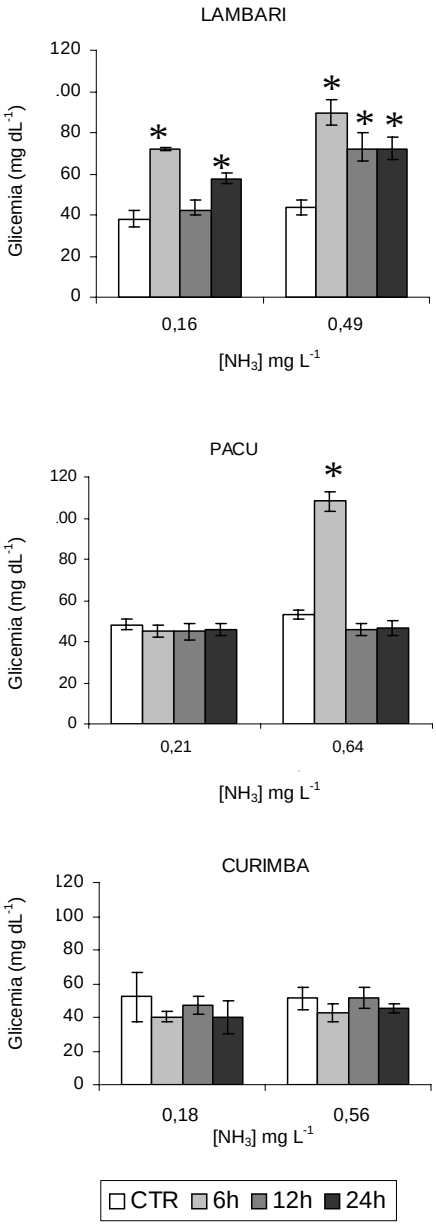

Figura 3 – Valores de glicemia obtidos para lambaris, pacus e curimbas expostos apenas à água (CTR) ou a duas concentrações subletais de NH_3, correspondentes a 25 e 75% da CL_{50}(24h), durante 6, 12 ou 24 horas. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. * indica valor significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

A hiperglicemia apresentada pelos lambaris e pacus está provavelmente associada à mobilização de substratos energéticos desencadeada pela resposta de estresse indicando que concentrações elevadas de amônia representam uma situação estressante para o peixe. Tal fenômeno também já foi observado para alevinos do ciprinídeo asiático *Cirrhinus mrigala* que apresentaram aumento progressivo da glicemia em função do aumento da quantidade de amônia na água (Das et al., 2004). Concentrações de amônia elevadas também promoveram uma situação de estresse para o teleósteo marinho *Scophthalmus maximus*, como indicado pelo aumento significativo dos níveis plasmáticos de cortisol (Person Le Ruyet at al., 1998).

A falta de resposta hiperglicêmica em curimbas expostos à amônia ilustra bem a ampla variação que os peixes exibem na resposta ao estresse (Barton e Iwama, 1991). Diferentes respostas aos mesmos estressores são evidentes em espécies de peixes intimamente relacionadas. Por exemplo, Ruane et al. (1999) e Barton (2000) mostraram, respectivamente, que após confinamento de curto prazo e manuseio rápido a truta marrom (*Salmo trutta*) exibiu maior aumento de cortisol que a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o mesmo ocorrendo em relação à resposta glicêmica apresentada por essas duas espécies. Além de fatores genéticos, a resposta de estresse pode variar em função do estágio de desenvolvimento do animal, pois apesar de limitadas, evidências sugerem que alguns peixes mostram um aumento na resposta de estresse ao longo de seu desenvolvimento (Barton, 2002). Assim, a falta de uma resposta hiperglicêmica nos curimbas pode estar refletindo as diferenças interespecíficas, quando se comparam diferentes espécies neotropicais, e ainda pode estar relacionada com o fato dos curimbas serem jovens enquanto os lambaris, os quais mostraram a resposta hiperglicêmica mais efetiva, eram adultos.

A exposição de peixes a concentrações letais ou subletais de amônia também pode causar alterações histológicas em alguns órgãos e tecidos de muitos peixes, como danos branquiais (Alabaster e Lloyd, 1982; Arana, 1997). Carpas comuns expostas à amônia durante 24 horas apresentaram elevação epitelial e hemorragia nas brânquias, danos branquiais que podem levar à hipóxia e distúrbios osmóticos (Peyghan e Azary Takami, 2002). Tilápias jovens expostas a concentrações elevadas de amônia durante 24 horas apresentaram hiperplasia do epitélio branquial e fusão das lamelas (Karasu Beli e Koksal, 2005).

As brânquias são órgãos multifuncionais que atuam como uma interface entre o animal e o ambiente, constituindo o local de tomada e de depuração de contaminantes e freqüentemente são os primeiros órgãos afetados por poluentes (Heath, 1995). Como desempenham papel fundamental para as trocas gasosas e para a regulação osmo-iônica, alterações histológicas branquiais podem afetar diretamente os mecanismos de respiração e osmorregulação. Assim, o exame histológico das brânquias de peixes, juntamente com informações funcionais, pode fornecer uma descrição mais completa e acurada sobre a atividade de um determinado agente químico, como a amônia (Martinez e Cólus, 2002).

As alterações histológicas branquiais decorrentes da exposição aguda a concentrações subletais de amônia foram basicamente as mesmas para lambaris, curimbas e pacus. Elevação epitelial, caracterizada pelo descolamento do epitélio lamelar, foi a alteração predominante na morfologia branquial dos peixes expostos à amônia, durante 24 horas (Figura 4). Em menor proporção alguns peixes

apresentaram incidência de hiperplasia das células do filamento e lamelas, a qual pode levar à fusão lamelar. Também se observou, em pequena quantidade, a incidência de aneurisma ou telangectasia, que se caracteriza pelo extravasamento de sangue no interior da lamela e rompimento das células pilares, com conseqüente dilatação dos canais sangüíneos. Essa alteração é considerada um tipo de lesão mais grave e muitas vezes irreversível, que envolve o rompimento do sistema de células pilares. Já a elevação epitelial e hiperplasia são alterações reversíveis e inespecíficas, que podem servir como defesa, com o aumento da distância de difusão entre a água e o sangue (Hinton et al., 1992), interferindo, entretanto, na eficiência das trocas gasosas e no transporte iônico. Essas alterações morfológicas, em resposta a mudanças ambientais, podem representar estratégias adaptativas para conservação de algumas funções fisiológicas.

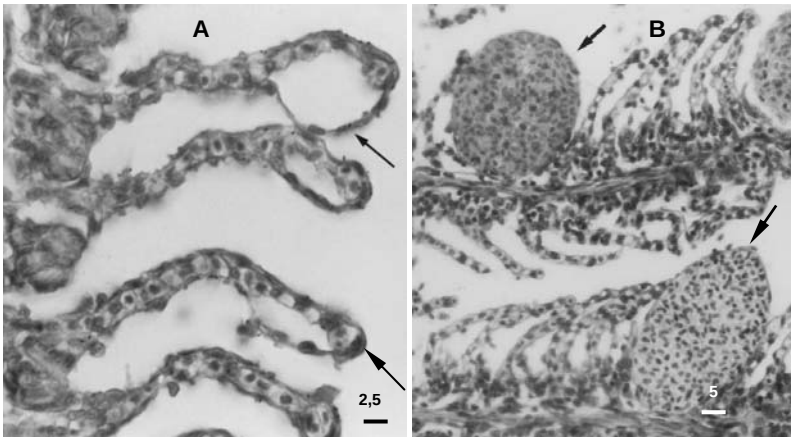

Figura 4 – Fotomicrografias de brânquias de curimbas após exposição a 0,56 mg L^{-1} de NH_3 durante 24 horas. (A) detalhe de lamelas mostrando elevação epitelial (setas); (B) detalhe de lamelas com aneurisma (setas). Barra de escala em μm.

3. Considerações finais

Os resultados dos testes de toxicidade da amônia para espécies de peixes neotropicais sugerem a necessidade de mais atenção para o estabelecimento de critérios para a qualidade da água e bem estar de espécies de peixes nativas em cofinamento. Concentrações de amônia aparentemente seguras para espécies exóticas, como o caso da tilápia do Nilo, podem ser letais para espécies nativas. As alterações encontradas em parâmetros hematológicos, iônicos e metabólicos, bem como alterações histológicas nas brânquias produzidas por concentrações subletais de amônia nas três espécies estudadas, indicam que concentrações de amônia não ionizada na ordem de 0,16 mg L^{-1} podem afetar o estado de saúde geral do peixe e, por conseguinte, interferir no seu crescimento e reprodução, contribuindo dessa forma para o insucesso do sistema de produção.

Agradecimentos

A Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina pelo fornecimento dos peixes utilizados neste estudo. Ao CNPq pela concessão de bolsa de Iniciação Científica para Fábio Azevedo (Programa PIBIC) e para Elissandra U Winkaler (Programa RHAE).

Bibliografia

Alabaster, J. S., and R. Lloyd. 1982. Water Quality Criteria for Freshwater Fish. 2ed. FAO, Cambridge, UK.

Arana, L.V. 1997. Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aqüicultura: Uma Revisão para Peixes e Camarões. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Arillo, A.; B. Uva, and M. Vallarino. 1981. Renin activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and effects of environmental ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology 68A: 307–315.

Arthur, J. W.; W.W. Corlis; K.N. Allen, and S.F. Hedtke. 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 38: 324-331.

Assis, J.M.F.; R.F. Carvalho; L. Barbosa; C.A. Agostinho, and M.D. Pai-Silva. 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Aquaculture 237: 251-267.

Baldisseroto, B. 2002. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Barton, B.A. 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. North American Journal of Aquaculture 62: 12-18.

Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology 42: 517-525.

Barton, B.A., and G.K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Reviews of Fishes Diseases 1: 3-26.

Bechara, J.A.; J.P. Roux; F.J.R. Díaz; C.I.F. Quintana, and C.A. Longoni de Meabe. 2005. The effect of dietary protein level on pond water quality and feed utilization efficiency of pacu Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887). Aquaculture Research 36: 546-553.

Bennemann, S.T., and O.A. Shibatta. 2002. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. Páginas 433-442 *in* M.E. Medri, E. Bianchini, O.A. Shibatta, e J. A. Pimenta, editores. A Bacia do Rio Tibagi. Edição dos Editores, Londrina, PR.

Bower, C.E., and J.P. Bidwell. 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. Journal of Fisheries Research Board of Canada 25: 1012-1016.

Brown, J.A. 1993. Endocrine response to environmental pollutants. Páginas 2765-296 *in* J.C. Rankin and F. B. Jensen, editor. Fish Ecophysiology. Chapman & Hall, Londres, UK.

Boyd, C.E. 1990. Water quality in ponds for aquaculture. International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, AL, USA.

Dal Pai, V.; M.D. Pai-Silva, E.D. Carvalho, C.Y. Fujihara, E.A. Gregório, and P.R. Curi. 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). Anatomia, Histologia, Embryologia - Journal of Veterinary Medicine Series C 29: 283-289.

Das, P.C.; S. Ayyappan, J.K. Jena, and B. K. Das. 2004. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Aquaculture Research 35: 134-143.

Emerson, K.; R.C. Russo; R.E. Lund, and R.V. Thurston. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. Journal of Fisheries Research Board of Canada 32: 2379-2383.

EPA – United States Environmental Protection Agency. 1999 Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia. EPA-822-R-99-014. EPA, Washington.

Fracalossi, D.M.; G. Meyer; F.M. Santamaria; M. Weingartner, and E. Zaniboni Filho. 2004. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. Acta Scientiarum 26(3): 345-352.

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

Heath, A.G. 1995. Water Pollution and Fish Physiology. 2 ed. Lewis Publishers, CRC Press Inc., Boca Ratón, FL, USA.

Hillaby, B.A., and D.J. Randall. 1979. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Fisheries Research Board of Canada 36: 621-629.

Hinton, D.E.; P.C. Baumann, G.R. Gardner; W.E. Hawkins; J.D. Hendricks; R.A. Murchelano, and M. S. Okihiro. 1992. Histopathologic biomarkers. Pages: 155 –196 *in*: R.J. Huggett. R.A. Kimerli, P.M. Mehrle Jr., and H.L. Bergman, editor. Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Pubishers, Boca Ratón, FL, USA.

Jobling, M. 1994 Fish Bioenergetics. Chapman & Hall, Londres, UK.

Jomori, R.K.; D.J. Carneiro, M.I.E.G. Martins, and M. C. Portella. 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. Aquaculture 243: 175-183.

Karasu Benli, A.C., and G. Köksal. 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 29: 339-344.

Leonhardt, J.H.; H. Frossard, and M. Caetano Filho. 2002. Piscicultura. Páginas 579-589 *in* M.E. Medri, E. Bianchini, O.A. Shibatta, and J. A. Pimenta, editors. A Bacia do Rio Tibagi. Edição dos Editores, Londrina, PR.

Martinez, C.B.R., e I.M. Cólus. 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. Páginas 551-577 *in* M.E. Medri, E. Bianchini, O.A. Shibatta, and J. A. Pimenta, editors. A Bacia do Rio Tibagi. Edição dos Editores, Londrina, PR.

Moraes, F.R., and M.L. Martins. 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. Páginas 343-383 *in* J.E.P. Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi, e N. Castagnolli, editores. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática (Aquabio), Jaboticabal, SP.

Moraes, G.; V.L. Polez, and G.K. Iwama. 2004. Biochemical responses of two Erythrynidae fish to environmental ammonia. Brazilian Journal of Biology 64(1): 95-102.

Paley, R.K.; I.D. Twitchen, and F. B. Eddy. 1993. Ammonia, Na^+, K^+ and Cl^- levels in rainbow trout yolk-sac fry in response to external ammonia. Journal of Experimental Biology 180: 273-284.

Person-Le Ruyet, J.; H. Chartois, and L. Quemener. 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. Aquaculture 136: 181-194.

Person-Le Ruyet, J.; G. Boeuf., J. Zambonino Infante, S. Helgason, and A. Le Roux. 1998. Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology 119A(2): 511-518.

Peyghan, R., and G. Azary Takami. 2002. Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in commom carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention. Aquaculture International 10: 317-325.

Prioli, S.M.A.P.; A.J. Prioli; H.F. Júlio; C.S. Pavanelli, A.V. Oliveira, H. Carrer, D.M. Carraro, and L.M. Prioli. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 25: 421-430.

Randall, D.J., and P.A. Wright. 1987. Ammonia distribution and secretion in fish. Fish Physiology and Biochemistry 3(3): 107-120.

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

Ruane, N.M., S.E. Wendelaar Bonga, and P.H.M. Balm. 1999. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. General and Comparative Endocrinology 113: 21-219.

Smart, G. 1976 The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Fish Biology 8: 471-475.

Thomas, P. 1990 Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. Pages: 9-28 *in* S. M. Adams, editor. Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Society, Maryland, USA.

Twitchen, I.D., and F.B. Eddy. 1994. Sublethal effects of ammonia on freshwater fish. Páginas 135-147 *in* R. Müller and R. Lloyd (Editores), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Blackwell Scientific Publications, Fishing New Books, Londres, UK.

Tomasso, J. R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. Reviews in Fisheries Science 2: 291-314.

Urbinati, E.C., and P.C.F. Carneiro. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. Páginas 171-193 *in* J.E.P. Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi, and N. Castagnolli, editores. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática (Aquabio). Jaboticabal, SP.

Walker, C.H.; S.P. Hopkin, R.M. Sibly, and D. B. Peakall. 1996. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, Londres, UK.

Wendelaar Bonga, S. 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews 77: 591-625.

Wilson, R. 1996. Ammonia excretion in fish adapted to an ion-poor environment. Pages 123-138 *in* A.L. Val, V.M.F. Almeida-Val, and D. J. Randall, editor. Physiology and Biochemistry of The Fishes of the Amazon. INPA, Manaus.

Zaniboni-Filho, E.; S. Meurer, J.I. Golombieski, L.V.F. Silva, and B. Baldisseroto. 2002. Survival of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) fingerlings exposed to acute pH changes. Acta Scientiarum 24(4): 917-920.