

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

**EFEITO AGUDO E SUBCRÔNICO DA AMÔNIA SOBRE A TILÁPIA
DO NILO *Oreochromis niloticus***

FRANKLIN FERNANDO BATISTA DA COSTA

Belo Horizonte

2018

FRANKLIN FERNANDO BATISTA DA COSTA

**EFEITO AGUDO E SUBCRÔNICO DA AMÔNIA SOBRE A TILÁPIA
DO NILO *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho

Coorientador: Ronald Kennedy Luz

Belo Horizonte

2018

DISSERTAÇÃO defendida e aprovada em 09 de fevereiro de 2018 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:



Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho
(Orientador)



Prof. Dr. Galileu Crovatto Veras



Dr. Filipe dos Santos Cipriano

C837e Costa, Franklin Fernando Batista da, 1986-
Efeito agudo e subcrônico da amônia sobre a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* /
Franklin Fernando Batista da Costa. – 2018.
52 p. : il.

Orientador: Kleber Campos Miranda Filho
Coorientador: Ronald Kennedy Luz
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Tilápia (Peixe) – Criação – Teses. 2. Produção animal – Teses. 3. Amônia – Teses.
4. Compostos nitrogenados – Teses. 5. Toxicidade – Testes – Teses. I. Miranda Filho, Kleber
Campos. II. Luz, Ronald Kennedy. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

CDD – 639.31

EPÍGRAFE

Então lhes contou esta parábola: "A terra de certo homem rico produziu muito bem.

Ele pensou consigo mesmo: 'O que vou fazer? Não tenho onde armazenar minha colheita'.

"Então disse: 'Já sei o que vou fazer. Vou derrubar os meus celeiros e construir outros maiores, e ali guardarei toda a minha safra e todos os meus bens.

E direi a mim mesmo: Você tem grande quantidade de bens, armazenados para muitos anos. Descanse, coma, beba e alegre-se'.

"Contudo, Deus lhe disse: 'Insensato! Esta mesma noite a sua vida lhe será exigida. Então, quem ficará com o que você preparou?'

"Assim acontece com quem guarda para si riquezas, mas não é rico para com Deus".

Dirigindo-se aos seus discípulos, Jesus acrescentou: "Portanto eu lhes digo: não se preocupem com suas próprias vidas, quanto ao que comer; nem com seus próprios corpos, quanto ao que vestir.

A vida é mais importante do que a comida, e o corpo, mais do que as roupas.

Observem os corvos: não semeiam nem colhem, não têm armazéns nem celeiros; contudo, Deus os alimenta. E vocês têm muito mais valor do que as aves!

Quem de vocês, por mais que se preocupe, pode acrescentar uma hora que seja à sua vida?

Visto que vocês não podem sequer fazer uma coisa tão pequena, por que se preocupar com o restante?

"Observem como crescem os lírios. Eles não fiam, nem tecem. Contudo, eu lhes digo que nem Salomão, em todo o seu esplendor, vestiu-se como um deles.

Se Deus veste assim a erva do campo, que hoje existe e amanhã é lançada ao fogo, quanto mais vestirá vocês, homens de pequena fé!

Não busquem ansiosamente o que hão de comer ou beber; não se preocupem com isso.

Pois o mundo pagão é que corre atrás dessas coisas; mas o Pai sabe que vocês precisam delas.

Busquem, pois, o Reino de Deus, e essas coisas lhes serão acrescentadas.

Lucas 12:16-31

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco e Neusa

A Livia e meus irmãos, Francielle e Júnio

Aos meus “afilhados” Henrique e Gabriel, e a
minha sobrinha Alice,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Kleber Miranda pelo suporte na condução deste trabalho e pela orientação durante esses anos. Mas, mais do que isso, agradeço pela amizade e pelo exemplo como pessoa e como profissional.

Agradeço aos meus pais por me apoiarem e darem condições para que eu me dedicasse aos estudos e especificamente nesses dois anos de mestrado.

A Livia por toda atenção, incentivo e apoio durante a caminhada acadêmica.

A todos os familiares que torceram e torcem por mim, como minha tia Nenzinha, que sempre se lembra de mim em suas orações.

Ao Márcio, pela grande contribuição na execução deste trabalho e por toda transferência de conhecimento, bem como pela amizade e os inúmeros conselhos.

Agradeço ao João, Ricardo e Luana pela relevante ajuda nas análises e pelo companheirismo no cotidiano do laboratório.

Ao Marquinho, pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao Filipe Cipriano pelos conselhos, apoio amizade.

Agradeço também a Deliane pela amizade e pelos conselhos ao longo de nossa convivência.

Enfim, agradeço a todos os amigos que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho e pelo apoio durante a jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 Introdução	15
2 Revisão de Literatura	16
3 Referências Bibliográficas	20
4 Objetivos gerais.....	22
5 Artigo.....	23
RESUMO	23
ABSTRACT.....	24
5.1 INTRODUÇÃO	25
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.3 RESULTADOS	31
5.4 DISCUSSÃO	39
5.5 Conclusão	44
5.6 Referências Bibliográficas	44
6 Considerações finais.....	49

LISTA DE TABELAS

Artigo: Efeito agudo e subcrônico da amônia sobre a tilápia *Oreochromis niloticus*

Tabela 1. Média (\pm DP) dos parâmetros sanguíneos de <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição aguda à amônia.....	33
Tabela 2. Média (\pm DP) dos parâmetros sanguíneos de <i>Oreochromis niloticus</i> no teste de toxicidade subcrônica para amônia.....	34
Tabela 3. Média (\pm DP) dos parâmetros sanguíneos de <i>Oreochromis niloticus</i> após o teste de desintoxicação para amônia	35
Tabela 4. Índices de lesões branquiais (IG) em juvenis de tilápias do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> após exposição aguda (96 h), teste subcrônico (8 dias) e desintoxicação (4 dias).	39

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO: Efeito agudo e subcrônico da amônia sobre a tilápia *Oreochromis niloticus*

Figura 1. Fotomicrografia de brânquias de tilápias após exposição aguda (96 horas) à amônia....37

Figura 2. Fotomicrografia de brânquias de tilápias após exposição subcrônica (8 dias) ao NH₃....37

Figura 3. Fotomicrografia de brânquias de tilápias após o período de desintoxicação (4 dias).....39

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALT	Alanina aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Amônia total
CEUA	Comissão De Ética Para Uso De Animais
CL ₅₀	Concentração letal mediana
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
LAQUA	Laboratório de aquacultura
mg/L	Miligrama por litro
N-NH ₃	Nitrogênio na forma de amônia
NH ₄ ⁺	Íon amônio
N-NO ₂ ⁻	Nitrogênio na forma de nitrito
NS	Nível de segurança
g/dL	grama por decilitro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
UI	Unidade Internacional

RESUMO

A presença de compostos nitrogenados em ambientes de confinamento e produção comercial de peixes é algo frequente. Estes compostos podem ser encontrados na forma de NH_3 , NO_2^- e NO_3^- , que podem atingir elevados níveis especialmente em sistemas de alta retenção de água. A amônia é a forma nitrogenada mais tóxica para os organismos aquáticos devido a sua capacidade de provocar danos ao organismo. A tilápia do Nilo é umas das espécies de peixes mais cultivadas no mundo, contudo, sua produção em sistemas intensificados, encontra problemas relativos ao acúmulo de amônia. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo estimar a concentração segura deste composto para juvenis de tilápia, estudar e avaliar as alterações causadas nos tecidos, hemático e branquial, decorrentes da exposição aguda e subcrônica à amônia e a eficácia do período de desintoxicação, buscando compreender o reflexo deste composto na criação de peixes. Os testes de toxicidade aguda duraram 96 h, enquanto o teste subcrônico e o período de desintoxicação duraram 8 e 4 dias, respectivamente. Grupos de 12 juvenis de tilápia ($12,76 \pm 1$, 24 cm e $34,07 \pm 10,42$ g) foram alocados em 20 tanques de 100 L de água e constituíram os tratamentos que receberam concentrações crescentes de amônia, com exceção do período de desintoxicação. Todos os tratamentos foram realizados com duas réplicas. Na etapa aguda, os animais foram submetidos às concentrações $0,42 \pm 0,03$; $0,87 \pm 0,18$; $1,52 \pm 0,25$; $2,00 \pm 0,21$; $3,77 \pm 0,46$; $5,02 \pm 0,50$; $5,52 \pm 0,63$; $8,43 \pm$ e $8,71 \pm 0,06$ mg/L N- NH_3 e na etapa crônica às de $0,42 \pm 0,03$; $0,87 \pm 0,18$; $1,52 \pm 0,25$; $2,00 \pm 0,21$ e $3,77 \pm 0,46$ mg/L N- NH_3 . Os animais remanescentes dos testes agudo e crônico perfizeram os tratamentos 6 e 12 mg/L N-AT, etapa de desintoxicação. A CL_{50} estimada para amônia em 24, 48, 72 e 96 h neste estudo foi de 133,29; 124,58; 113,52 e 112,57 mg/L N-AT; 6,08; 5,32; 4,42 e 4,35 mg/L N- NH_3 , respectivamente. Os parâmetros médios de lactato, ALT, AST, glicose e ureia foram maiores nas concentrações mais elevadas em comparação ao controle ($P < 0,05$). A análise histopatológica revelou alterações nas brânquias dos animais expostos a amônia nos testes agudo (96 h), subcrônico (8 dias) e nos animais do período de desintoxicação (4 dias). Hiperplasia com fusão lamelar, perda da estrutura lamelar secundária, lamelas tortuosas com severa perda da estrutura, necrose, descolamento do epitélio, hiperplasia, aneurisma e edema foram lesões encontradas nas brânquias de animais do teste agudo e subcrônico. Houve recuperação nas brânquias de animais que passaram para o período de desintoxicação, contudo, ainda apresentavam algumas alterações. Os juvenis de tilápia se mostraram tolerantes a amônia e os níveis de segurança estimados foram considerados de fato seguros. O período de desintoxicação é eficiente para a recuperação de juvenis de tilápia intoxicados por amônia.

ABSTRACT

The presence of nitrogen compounds in closed environments and commercial fish production is frequent. These compounds can be found in the form of NH_3 , NO_2^- and NO_3^- , which can reach high levels especially in water retention systems such as Recirculated Aquaculture Systems (RAS) and Biofloc Technology (BFT). The toxicity of each of these compounds to culture animals is dependent on the concentration in the environment. Among the nitrogenous forms cited, ammonia is the most toxic to aquatic organisms due to its ability to cause damage to the animal's body. Nile tilapia is one of the most cultivated species of fish in the world, yet its production in intensified environments encounters problems with ammonia accumulation. In view of the above, the objective of this study was to estimate the LC_{50} of this compound for tilapia juveniles, besides studying and evaluating the changes caused in the hemic and gill tissues due to the acute and subchronic exposure to ammonia and the effectiveness of the detoxification period. The acute toxicity tests lasted 96 h, while the subchronic test and the detoxification period lasted 8 and 4 days, respectively. Groups of 12 juveniles of tilapia (12.76 ± 1.24 cm and 34.07 ± 10.42 g) were allocated in 20 tanks of 100 L of water and constituted the treatments that received increasing concentrations of ammonia, with exception of the detoxification period. All treatments were performed with two replicates. In the acute stage, the animals were submitted to concentrations 0.42 ± 0.03 ; 0.87 ± 0.18 ; 1.52 ± 0.25 ; 2.00 ± 0.21 ; 3.77 ± 0.46 ; 5.02 ± 0.50 ; 5.52 ± 0.63 ; $8.43 \pm$ and 8.71 ± 0.06 mg.L^{-1} - $\text{NH}_3\text{-N}$ and in the chronic stage at 0.42 ± 0.03 ; 0.87 ± 0.18 ; 1.52 ± 0.25 ; 2.00 ± 0.21 and 3.77 ± 0.46 mg.L^{-1} $\text{NH}_3\text{-N}$. The remaining animals from the acute and subchronic tests were used in subchronic experiment (06 and 12 mg.L^{-1} TA-N). The estimated LC_{50} for ammonia at 24, 48, 72 and 96 h in this study was 133.29; 124.58; 113.52 and 112.57 mg.L^{-1} TA-N; 6.08; 5.32; 4.42 and 4.35 mg.L^{-1} $\text{NH}_3\text{-N}$, respectively. The mean lactate, ALT, AST, glucose and urea parameters increased in the higher ammonia concentrations compared to the control ($P < 0.05$). Histopathological analysis revealed alterations in the gills of animals exposed to ammonia in the acute (96 h), subchronic (8 days) and detoxification (4 days) tests. Hyperplasia with lamellar fusion, loss of secondary lamellar structure, lamellae with severe loss of structure, necrosis, epithelial detachment, hyperplasia, aneurysm and edema were lesions found in the gills of the acute and subchronic test animals. There was recovery in the gills of animals that went to the detoxification period, however, they still presented alterations. Tilapia juveniles were tolerant to ammonia and the estimated safety

levels were considered real. The detoxification period is efficient for the recovery of tilapia juveniles intoxicated by ammonia.

1 INTRODUÇÃO

A crescente população humana (9,7 bilhões de pessoas em 2050) (FAO, 2016), tem demandado cada vez mais por fontes alternativas de alimento. A pesca e a aquicultura são importantes setores responsáveis pela alimentação de uma parcela significativa dessas pessoas em todo o mundo. Entre os anos de 2013 e 2015, a pesca contribuiu com 56%, enquanto a aquicultura contribuiu com 44% de todo o pescado consumido no mundo (166,8 milhões de toneladas) (FAO 2016). Contudo, estima-se que até 2025 esse quadro sofra uma inversão, passando a pesca a contribuir com 48% e a aquicultura com 52% (FAO, 2016).

As principais espécies produzidas pela aquicultura no mundo são provenientes de cultivo em água doce. Segundo dados da FAO (2016), os produtos da aquicultura continental giraram em torno de 47,1 milhões de toneladas, enquanto a aquicultura marinha contribuiu com 26,1 milhões de toneladas. No Brasil, a aquicultura é desenvolvida em todas as unidades da Federação, sendo a piscicultura continental a principal modalidade praticada em todo o país. A produção total da piscicultura brasileira, em 2016, foi de 507,12 mil toneladas (IBGE, 2016). A principal espécie cultivada no país é a tilápia, cujo valor de produção em 2016 girou em torno de 1,3 bilhão de reais (IBGE 2016). Constatou-se também um aumento de 9,3% na produção da espécie em relação a 2015 (IBGE 2016). Em termos globais, a tilápia ocupa a segunda colocação no ranking dos peixes de água doce mais produzidos, que é liderado pelas carpas (FAO, 2016).

As tilápias são conhecidas em todo o mundo como peixes com elevada rusticidade e capacidade de adaptação a uma diversidade de condições ambientais: baixa concentração de oxigênio dissolvido, ampla faixa de temperatura, salinidade e tolerância aos compostos nitrogenados. Essa plasticidade, entre outros fatores foi o que colocou a tilápia, juntamente com as carpas no topo da lista dos peixes mais produzidos do mundo (El-Sayed, 2006). Contudo, os ambientes de cultivo, cada vez mais intensificados, tanto quanto possível, oferecem riscos à saúde dos animais, bem como ao seu desempenho zootécnico. A necessidade do manejo nos sistemas de produção, assim como as eventuais oscilações de temperatura, oxigênio, pH, alcalinidade e a exposição a certas concentrações dos diferentes compostos nitrogenados podem acabar por colocar os animais em um quadro de estresse. Em decorrência disso, os resultados podem ser de debilidade dos animais, prejuízos à reprodução, ao crescimento, vulnerabilidade às doenças, entre outras consequências.

Dada a importância crescente da tilápia para a aquicultura, faz-se necessário o estudo voltado especialmente à qualidade do ambiente de cultivo, de forma a otimizar sua produção. Entre os possíveis agentes estressores no ambiente de cultivo, estão os compostos nitrogenados, quais sejam: amônia, nitrito e nitrato, que podem causar problemas a saúde dos animais por meio de seus efeitos agudos, subcrônicos ou crônicos. A amônia é um dos compostos mais importantes para os peixes e em função da escassez de informações mais aprofundadas a respeito de sua interação com estes organismos, faz-se necessário o estudo mais aprofundado de seus efeitos deletérios sobre a tilápia, dada sua importância econômica no cenário mundial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A tilápia do Nilo

Pertencentes à família Cichlidae (Perciformes), as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) são peixes de água doce oriundos da África, mas que foram introduzidos em muitas regiões tropicais, subtropicais e temperadas ao longo da segunda metade do século 20 (Pillay, 1990). Essa dispersão em diversas regiões do globo foi possível graças a uma plasticidade peculiar à tilápia, mas o que de fato a tornou uma candidata ideal para a aquicultura, especialmente em países em desenvolvimento, foram as seguintes características: crescimento rápido; tolerância a uma ampla gama de condições ambientais (como temperatura, salinidade, baixo oxigênio dissolvido e compostos nitrogenados.); resistência ao estresse e à doença; capacidade de se reproduzir em cativeiro e curto período entre gerações; alimentação em baixos níveis tróficos e aceitação de alimentos artificiais imediatamente após a absorção do saco vitelino (El-Sayed, 2006).

Com valores próximos de 4 milhões de toneladas, a tilápia ocupa a segunda colocação no ranking dos peixes de água doce mais produzidos no mundo, atrás apenas das carpas, que somam 22,6 milhões de toneladas (FAO, 2016). O número de países produtores de tilápia passa de 100 e dentre eles está o Brasil, cuja produção está ao redor de 239,09 mil toneladas, sendo o peixe de água doce mais produzido no país no ano de 2016 (47,1%) (IBGE, 2016).

Apesar de sua conhecida capacidade de tolerar condições adversas nos ambientes de cultivo, a tilápia necessita que sejam atendidos requisitos mínimos não somente para a sua sobrevivência, mas para que tenha um desempenho zootécnico satisfatório. O

ambiente, por sua vez, está constantemente sujeito a alterações físico-químicas, como de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, e acúmulo de compostos nitrogenados. Estas alterações podem decorrer de fenômenos naturais ou de ações antrópicas, como o adensamento dos animais, arraçoamento inadequado, entre outras intervenções que podem interferir na dinâmica do ambiente de cultivo.

A qualidade da água em cultivos de organismos aquáticos

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece os requisitos mínimos de qualidade de água que os empreendimentos aquícolas devem atender para o cultivo seguro de organismos aquáticos. A qualidade da água é classificada segundo parâmetros físicos, químicos e biológicos, e o conhecimento destes fatores é fundamental para nortear o caminho na implantação ou manutenção de empreendimentos aquícolas, uma vez que, não só a sobrevivência, mas o desempenho zootécnico dos organismos cultivados está intimamente atrelado à qualidade do ambiente de cultivo.

Espera-se dos animais confinados em cultivos que estes atendam a expectativas tais como: máxima sobrevivência, reprodução de qualidade e em períodos regulares, boa conversão alimentar e crescimento (Sánchez e Matsumoto, 2012). Contudo, essas expectativas podem ser frustradas diante de resultados insatisfatórios que podem ter sua origem na má qualidade do ambiente, em circunstâncias em que os requisitos exigidos pela espécie não são atendidos, tais como: concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, alcalinidade, condutividade e valores reduzidos de amônia e nitrito.

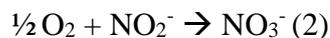
Dinâmica dos compostos nitrogenados na água e a toxicidade da amônia para organismos aquáticos

Nos ambientes de cultivo, a alimentação dos peixes é normalmente feita por rações com elevado nível proteico. O percentual de proteínas que não é aproveitado pelo organismo animal é excretado principalmente na forma de amônia não ionizada na água. Logo, quanto maiores, a ingestão de um mesmo alimento e a porcentagem de proteína na ração, maior será a excreção amoniacal (Randall e Tsui, 2002). A amônia também pode ser oriunda da aplicação de fertilizantes e adubação orgânica após a sua mineralização por microorganismos presentes no meio.

No ambiente aquático (em meio oxidante), a amônia sofre oxidação realizada por bactérias nitrificantes (principalmente do gênero *Nitrosomonas*), sendo transformada em nitrito (NO_2^-) (vide reação 1) (Baldisserotto, 2016).



Já o nitrito, ao ser oxidado principalmente por bactérias do gênero *Nitrobacter*, é convertido a nitrato (NO_3^-) (vide reação 2) (Baldisserotto, 2013):



A amônia é encontrada no meio hídrico nas formas: ionizada (NH_4^+ ou amônio) e não-ionizada (NH_3 , amônia ou amônia gasosa). A proporção dessas formas no ambiente aquático dependerá principalmente do pH e, em menor escala, da temperatura e da concentração de íons na água. A forma não ionizada é extremamente tóxica e passível de se difundir através das membranas biológicas (Baldisserotto, 2016). Isso se dá devido à característica lipofílica da amônia (NH_3), sendo facilmente excretada através das membranas respiratórias, ao passo que o íon amônio (NH_4^+) possui menor capacidade de se difundir pelas membranas, dada sua característica lipofóbica (Randall e Tsui, 2002).

O acúmulo de amônia no ambiente de cultivo e no organismo dos peixes pode promover uma série de consequências fisiológicas, tais como: desordens celular em órgãos e sistemas; paralisação da atividade alimentar e consequente queda na taxa de crescimento; prejuízos à atividade osmorregulatória e ao transporte de oxigênio aos tecidos; modificações histológicas nos rins, fígado, baço, tecidos tireóideos e alterações sanguíneas; além de tornarem os animais mais suscetíveis às doenças (Miranda-Filho et al., 2009; Miranda-Filho e Costa, 2016; Silva et al., 2018). Além disso, a intoxicação por amônia afeta o crescimento de uma forma ainda mais direta, quando bloqueia o processo de fosforilação oxidativa, impedindo a conversão da energia dos alimentos em ATP (Russo, 1985).

Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade são ferramentas de grande importância na toxicologia aquática e suas diretrizes para aplicação são estabelecidas por órgãos normativos específicos como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), “United States Environmental Protection Agency” (USEPA) e “European Environment Agency” (EEA).

Nos testes de toxicidade com organismos aquáticos, objetiva-se identificar os efeitos adversos causados por agentes químicos presentes no ambiente, bem como as concentrações que afetam a saúde dos animais (Miranda-Filho et al., 2009; Miranda-Filho e Costa, 2016). Na aquicultura, estes testes são ferramentas de elevada importância para se verificar a tolerância dos organismos aquáticos a poluentes como compostos nitrogenados ou a fármacos.

Para tanto, são realizados bioensaios com os organismos de interesse, que podem ser submetidos a testes de toxicidade de natureza aguda ou crônica. Os testes agudos são ensaios de curto período que resultam em respostas rápidas quanto aos efeitos tóxicos letais provocados pelos compostos químicos sobre os organismos aquáticos. A determinação da Concentração Letal Mediana (CL_{50}), que pode variar entre 24 a 96 h, é o objetivo principal do teste agudo. A CL_{50} é definida como a concentração suficiente para levar a óbito 50% dos animais submetidos ao ensaio. Por meio dos resultados dos testes agudos, pode-se estabelecer valores seguros dos produtos químicos para os animais, além de fornecer informações básicas para testes mais criteriosos como os testes subcrônicos e crônicos. Os testes subcrônicos e crônicos, por sua vez, baseiam-se na exposição dos organismos-teste durante um período significativo de suas vidas ao agente tóxico em concentrações sub-letais. Os efeitos causados pela exposição a agentes tóxicos podem ser avaliados por meio de análises histológicas, hematológicas e comportamentais, que são conhecidos como biomarcadores.

Biomarcadores

Os biomarcadores, em um sentido amplo, são definidos como medidas que refletem interações entre sistemas biológicos e riscos potenciais, que podem ser químicos, físicos ou biológicos (WHO, 1993). São alterações decorrentes de respostas biológicas que podem estar associadas à exposição aos compostos tóxicos presentes no ambiente (Peakall, 1994), podendo fornecer informações importantes sobre a exposição e o estresse tóxico do organismo (Oost et al., 2003; Silva et al., 2018). Quadros de estresse provocados por poluentes normalmente desencadeiam uma cascata de respostas biológicas, cada uma das quais podem, em teoria, servir como biomarcadores (McCarthy et al., 1991). Dessa forma, medições de fluidos corporais, células ou tecidos e até mesmo comportamento que indiquem em termos bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes podem ser definidos como biomarcadores (Monserrat et al., 2007) e são considerados importantes ferramentas na pesquisa com organismos aquáticos.

Alterações bioquímicas e fisiológicas no organismo podem se manifestar em consequências histopatológicas, caracterizadas por lesões celulares, teciduais ou nos órgãos (Hinton e Laurén, 1990; Hinton et al., 1992). A intoxicação por poluentes aquáticos pode desencadear esse processo e o exame (histológico) de órgãos específicos e células alvo pode se constituir em biomarcadores eficazes para tipificar os danos provocados pela intoxicação. Os biomarcadores histopatológicos permitem diferenciar

lesões induzidas por doenças e outros fatores do meio ambiente, daquelas resultantes da exposição a poluentes (Schwaiger et al., 1997; Silva et al., 2018). Em organismos aquáticos, as brânquias, o fígado e os rins são biomarcadores histopatológicos de grande importância no estudo relacionado a contaminação por poluentes aquáticos, uma vez que estão em contato direto com agentes tóxicos presentes na água e por exercer funções tais como: metabólicas, de excreção e osmorregulação (Bernet et al., 1999).

As brânquias são órgãos com funções vitais para os peixes, sendo nelas realizadas funções como: troca de gases, regulação iônica, equilíbrio ácido-base e excreção de resíduos nitrogenados (Evans, 1987). Devido ao seu contato constante com o meio externo, este órgão é o primeiro alvo de poluentes presentes na água, estando sujeito ao aparecimento de alterações histopatológicas (Mallatt, 1985). Quando expostas a poluentes, as brânquias apresentam alterações para fazer frente à intoxicação, ocorrendo em muitos casos o aumento da distância entre as lamelas e, dessa forma, diminuindo a área de contato com o poluente. Essa reação, no entanto, culmina na diminuição de incorporação de oxigênio, podendo evoluir para um quadro de hipóxia no peixe (Evans et al., 2006; Miron et al., 2008; Silva et al., 2018).

O sangue dos peixes é um biomarcador cada vez mais utilizado em pesquisas toxicológicas e de monitoramento ambiental, atuando como indicador de alterações fisiológicas e patológicas decorrentes de circunstâncias estressantes (Vázquez e Guerrero, 2007; Silva et al., 2018). O reflexo fisiopatológico de todo o corpo é expressado no sangue, sendo seus parâmetros de grande importância no diagnóstico estrutural e funcional dos peixes expostos a substâncias tóxicas (Adhikari et al., 2004). Dessa forma, análises de sangue em peixes submetidos às concentrações tóxicas de amônia podem expressar valores anormais de íons, enzimas e células plasmáticas, constituindo respostas de grande valor para o conhecimento do quadro clínico dos animais (Vázquez e Guerrero, 2007; Silva et al., 2018).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, D.S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T., Ayyappan, S., 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58(2), 220-226.
- Baldisserotto, B., 2016. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 3ª Edição. Ed. UFSM, Santa Maria. 350 pp.

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-34.
- Colt, J., Armstrong, D., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusc. In: Allen, L., Kinney, E. Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture. Fish Culture Section of the American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- El-Sayed, A-F.M., 2006. Tilapia culture. CABI Publishing, Oxfordshire, UK. 277 pp.
- Evans, D.H., 1987. The Fish Gill: Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. *Environ. Health Perspect.* 71, 47-58.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2016 The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome, Italy. 200 pp.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihiro, M.S. 1992. Histopathologic Biomarkers. In: Huggett R.J., Kimerli, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L., (Eds.), Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers., Boca Raton, pp. 155-196.
- Hinton, D.E., Laurén, D.J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 8, 51- 66.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2016. Produção da Pecuária Municipal, 2016. Brasil. 44, pp. 34.
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42, 630-646.
- McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., Shugart, L.R. 1991. Conceptual strategy for design, implementation and validation of a biomarker based biomonitoring capability. Publication n. 3072, ORNL/TM- 11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- Miranda-Filho, K.C., Costa, L.D.F., 2016. Deleterious effects of ammonia and nitrite to fish and crustaceans, chapter 26. In: Tavares-Dias, M., Mariano, W.S. (Eds.), *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. Vol. 2. São Carlos, Pedro & João Editores, pp. 545-578
- Miranda-Filho, K.C., Pinho, G.L.L., Wasielesky, W.J., Bianchini, A., 2009. Long-term ammonia toxicity to pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 150, 377-382.
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Ghaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution Biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 146, 221-234.
- Mulcahy, M.F., 1975. Fish blood changes associated with disease: a hematological study of pike lymphoma and salmon ulcerative dermal necrosis. In: Ribelin, W.E., Migaki Madison, C., (Eds.), *The Pathology of Fishes*. University of Wisconsin., Wisconsin, pp. 925-944.
- Oost, D., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13(2), 57-149.

- Peakall, D.B., Walker, C.H., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Ecotoxicol.* (3) pp. 173-179.
- Pillay, T.V.R., 1990. *Aquaculture Principles and Practices*. Fishing. News Books, Blackwell Science. Oxford, UK. 575 pp.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.*, 45(1-12), 17-23.
- Russo, R., 1985. Amônia, nitrite and nitrate. In: G. Rand e S. Petrocelli., (eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Pub. Corp. New York, pp. 455-471.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress.*, 6(1), 75-86.
- Silva, M.J.S., Costa, F.F.B., Leme, F.P., Takata, R., Costa, D.C., Mattioli, C.C., Luz, R.K., Miranda-Filho, K.C. 2018. Biological responses of neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. *Sci. Total Environ.* 616-617, 1566-1575.
- World Health Organization. International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

4 OBJETIVOS

- Analisar a toxicidade aguda da amônia e seu nível de segurança em juvenis da tilápia *Oreochromis niloticus* em ambiente semi-estático, estimando as Concentrações Letais Medianas (CL₅₀) em 24, 48, 72 e 96 h.
- Demonstrar as alterações causadas nos tecidos hemático e branquial decorrentes da exposição aguda e crônica à amônia e verificar a eficácia do período de desintoxicação.

5 ARTIGO

Efeito agudo e subcrônico da amônia sobre a tilápia *Oreochromis niloticus*

Franklin Fernando Batista da Costa ^a; Márcio José dos Santos Silva ^a; Rodrigo Takata ^b;
João Paulo Silva Lorenzini ^a, Ronald Kennedy Luz ^a, Kleber Campos Miranda Filho ^a

^a Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

^b Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro-FIPERJ, Pç. Fonseca Ramos s/nº– Terminal Rodoviário Roberto Silveira, CEP 24030-020, Niterói, RJ.

RESUMO

A amônia é o composto nitrogenado mais tóxico para organismos aquáticos em sistemas de cultivo e pode causar diversos prejuízos à saúde dos animais. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo estimar a CL₅₀ deste composto para juvenis de tilápia, além de estudar e avaliar as alterações causadas nos tecidos hemático e branquial decorrentes da exposição aguda e crônica à amônia e a eficácia do período de desintoxicação, buscando compreender o reflexo deste composto na criação de peixes. Os testes de toxicidade aguda tiveram duração de 96 h, enquanto o teste subcrônico e o período de desintoxicação duraram 8 e 4 dias, respectivamente. Grupos de 12 juvenis de tilápia (12,76±1,24 cm e 34,07±10,42 g) foram alocados em 20 tanques de 100 L de água e constituíram os tratamentos que receberam concentrações crescentes de amônia, com exceção do período de desintoxicação. Todos os tratamentos foram realizados com duas réplicas. Na etapa aguda, os animais foram submetidos às concentrações 0,42±0,03; 0,87±0,18; 1,52±0,25; 2,00±0,21; 3,77±0,46; 5,02±0,50; 5,52±0,63; 8,43± e 8,71±0,06 mg/L N-NH₃ e na etapa subcrônica a 0,42±0,03; 0,87±0,18; 1,52±0,25; 2,00±0,21 e 3,77±0,46 mg/L N- NH₃. Os animais remanescentes dos testes agudo e subcrônico foram mantidos nos tratamentos 6 e 12 mg/L N-AT, etapa de desintoxicação. A CL₅₀ estimada para amônia em 24, 48, 72 e 96 h foi de 133,29; 124,58; 113,52 e 112,57 mg/L N-AT; 6,08; 5,32; 4,42 e 4,35 mg/L N-NH₃, respectivamente. Os parâmetros médios de lactato, ALT, AST, glicose e ureia foram maiores nas concentrações mais elevadas, em comparação ao tratamento controle (P<0,05). A análise histopatológica revelou alterações nas brânquias dos animais

expostos a amônia nos testes agudo (96 h), subcrônico (8 dias) e nos animais do período de desintoxicação (4 dias). Hiperplasia com fusão lamelar, perda da estrutura lamelar secundária, lamelas tortuosas com severa perda da estrutura, necrose, descolamento do epitélio, hiperplasia, aneurisma e edema foram lesões encontradas nas brânquias de animais do teste agudo e subcrônico. Houve recuperação nas brânquias de animais que passaram para o período de desintoxicação, contudo, ainda apresentavam alterações. Os juvenis de tilápia se mostraram tolerantes a amônia e os níveis de segurança estimados foram considerados de fato seguros. O período de desintoxicação é eficiente para a recuperação de juvenis de tilápia intoxicados por amônia.

ABSTRACT

Ammonia is the most toxic nitrogenous compound for aquatic organisms in aquaculture systems and can cause various health hazards to animals. The aim of the present work was to estimate the LC_{50} of ammonia for tilapia juveniles, in addition to studying and evaluating the changes caused in the hemic and gill tissues due to the acute and chronic exposure and the effectiveness of the detoxification period, seeking to understand the reflection of this compound in fish farming. The acute toxicity tests lasted 96 h, while the subchronic test and the detoxification period lasted 8 and 4 days, respectively. Groups of 12 juveniles of tilapia (12.76 ± 1.24 cm and 34.07 ± 10.42 g) were allocated in 20 tanks of 100 L of water and constituted the treatments that received increasing concentrations of ammonia, with exception of the detoxification period. All treatments were performed with two replicates. In the acute test, the animals were submitted to concentrations $0,42 \pm 0,03$; $0,87 \pm 0,18$; $1,52 \pm 0,25$; $2,00 \pm 0,21$; $3,77 \pm 0,46$; $5,02 \pm 0,50$; $5,52 \pm 0,63$; $8,43 \pm 0,43$ and $8,71 \pm 0,06$ $mg \cdot L^{-1}$ N-NH₃ and in the subchronic test at $0,42 \pm 0,03$; $0,87 \pm 0,18$; $1,52 \pm 0,25$; $2,00 \pm 0,21$ and $3,77 \pm 0,46$ $mg \cdot L^{-1}$ N-NH₃. The remaining animals from the acute and subchronic tests were from treatments 6 and 12 $mg \cdot L^{-1}$ TA-N, detoxification step. The estimated LC_{50} for ammonia at 24, 48, 72 and 96 h in this study was 133.29; 124.58; 113.52 and 112.57 $mg \cdot L^{-1}$ TA-N; 6.08; 5.32; 4.42 and 4.35 $mg \cdot L^{-1}$ NH₃-N, respectively. The mean lactate, ALT, AST, glucose and urea parameters were higher with increasing concentrations of ammonia when compared to the control treatment. Histopathological analysis revealed alterations in the gills of animals exposed to ammonia in the acute (96 h), subchronic (8 days) and detoxification (4 days) tests. Hyperplasia with lamellar fusion, loss of secondary lamellar structure, lamellae with severe loss of structure, necrosis, epithelial detachment, hyperplasia, aneurysm and edema were lesions

found in the gills of the acute and subchronic test animals. There was recovery in the gills of animals that went to the detoxification period, however, they still presented alterations. Tilapia juveniles were tolerant to ammonia and the estimated safety levels were considered real. The detoxification period is efficient for the recovery of tilapia juveniles intoxicated by ammonia.

5.1 INTRODUÇÃO

Os desafios de se prover proteína animal a uma população que cresce vertiginosamente (9,7 bilhões de pessoas em 2050) (FAO, 2016), passam cada vez mais pelas potencialidades da aquacultura. A cada ano, a aquacultura contribui mais com a produção e o fornecimento de pescado, diferente da pesca, que se encontra em declínio (FAO, 2016).

As principais espécies de peixes produzidas pela aquacultura no mundo são de água doce e dentre elas está a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, que ocupa o segundo lugar no ranking de produção mundial, estando apenas atrás das carpas (FAO, 2016). A tilápia alcançou este patamar de produção devido a diversos fatores, tais como: boas características organolépticas, carne branca e firme, além de ser um peixe com elevada rusticidade, sendo capaz de suportar ambientes com baixa concentração de oxigênio dissolvido, ampla faixa de temperatura, salinidade e tolerância a compostos nitrogenados (El-Sayed, 2006). Contudo, a necessidade de intensificação dos sistemas de cultivo, que ocorre em função de fatores como escassez de água, regulações ambientais etc., podem gerar problemas na qualidade de água, dentre eles a presença frequente de compostos nitrogenados, tóxicos aos peixes (Costa et al., 2008; Miranda-Filho e Costa, 2016; Silva et al., 2018).

Os compostos nitrogenados são oriundos, principalmente, da excreção dos animais e do alimento não consumido por eles (Esteves, 1998). As formas nitrogenadas mais importantes para os peixes em ambientes de cultivo são a amônia (NH_3), o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-). A dinâmica dessas formas nos corpos hídricos se dá como se segue: a amônia, produto do catabolismo proteico, passa por um processo de oxidação realizado por bactérias nitrificantes (principalmente do gênero *Nitrosomonas*), sendo transformada em nitrito, que por sua vez é convertido a nitrato principalmente pela ação de bactérias do gênero *Nitrobacter* (Baldisserotto, 2013).

Dentre os compostos citados, a amônia é o mais tóxico (Regnault, 1987), estando presente no meio aquoso nas formas ionizada (NH_4^+ ou amônio) e não-ionizada (NH_3 ,

amônia ou amônia gasosa) (Carmouze, 1994). Essas formas vão depender majoritariamente do pH e, em menor escala, da temperatura e da concentração de íons na água. A forma não ionizada é mais tóxica para os peixes, sendo facilmente difundida pelas membranas biológicas (Baldisserotto, 2016), ao passo que o NH_4^+ possui menos afinidade pelas membranas, dada sua característica lipofóbica (Randall e Tsui, 2002).

A intoxicação por amônia pode desencadear nos peixes sérias consequências fisiológicas, tais como: deficiência no processo de osmorregulação, excreção e no transporte de oxigênio para os tecidos, além de alterações histológicas nas brânquias, rins, fígado, baço e tecidos tireóideos (Colt e Armstrong, 1981). A intoxicação por amônia também pode afetar o crescimento dos animais por influenciar a fosforilação oxidativa, situação em que a conversão da energia dos alimentos em ATP é prejudicada (Russo, 1985). A constatação dos tipos de lesões e outras possíveis alterações fisiológicas provocadas pela intoxicação da amônia nos animais pode ser feita por meio da análise de parâmetros biológicos, como fluidos corporais e tecidos específicos, conhecidos como biomarcadores (Peakall, 1994; Silva et al., 2018).

Os biomarcadores são ferramentas fundamentais no campo da investigação relacionada às ações de agentes tóxicos sobre os animais. Qualquer resposta biológica desencadeada por um químico ambiental ao nível subindividual, que seja medido no organismo ou em seus produtos, apontando desordens incomuns que não são observadas em um indivíduo intacto, podem ser considerados biomarcadores (Ventura et al., 2015). Na aquacultura, as consequências fisiológicas provocadas pela intoxicação de peixes por compostos nitrogenados são também investigadas por meio do uso de biomarcadores, sendo seus componentes biológicos utilizados para este fim (Arias et al., 2007; Silva et al., 2018).

Os testes de toxicidade aguda e subcrônica têm sido utilizados com frequência em estudos voltados para a padronização de valores aceitáveis de compostos tóxicos como amônia e nitrito em cultivos de organismos aquáticos (Randall e Tsui, 2002; Miranda-Filho et al., 2009; Miranda-Filho e Costa, 2016). Contudo, o processo de desintoxicação e os seus mecanismos inerentes são pouco relatados. Sabe-se que algumas lesões provocadas por agentes tóxicos são passíveis de serem sanadas por meio do processo de desintoxicação, uma vez que os peixes são capazes de se recuperar da ação do poluente (Bernet et al., 1999; Diaz-Quiroz e Echeverri, 2013; Fu et al., 2013; Silva et al., 2018).

Diante da problemática envolvendo o potencial tóxico da amônia em ambientes de cultivo intensivo e semi-intensivo de tilápias e a possibilidade da recuperação do

organismo após intoxicação, objetivou-se com este estudo avaliar a tolerância de juvenis de tilápia do Nilo *O. niloticus* à amônia, assim como estabelecer o nível seguro deste composto para a espécie, além de elucidar o processo de desintoxicação dos animais e verificar as possíveis alterações das variáveis sanguíneas e histopatológicas nas brânquias dos animais intoxicados.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Aquicultura – LAQUA do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais. O presente trabalho foi organizado da seguinte forma: intoxicação aguda e subcrônica com amônia com juvenis de tilápia, seguida por período de desintoxicação. As análises sanguíneas foram conduzidas no Laboratório de Patologia Clínica e o processamento histopatológico no Laboratório de Histopatologia, ambos pertencentes à Escola de Veterinária da UFMG.

Os juvenis de tilápia foram adquiridos do Laboratório de Larvicultura (LAQUA). Estes foram aclimatados pelo tempo de uma semana em um tanque de 2000 L de polipropileno, com temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e fotoperíodo, aferidos com o auxílio de um pHmetro portátil (Hanna, modelo HI 98130), um oxímetro (Hanna, modelo HI 9146) para o controle e manutenção do ambiente segundo recomendado para a espécie.

Teste de toxicidade aguda e subcrônica com juvenis de tilápia

Os experimentos de toxicidade seguiram o protocolo 106/11 aprovado pela comissão de ética para uso de animais CEUA/UFMG.

Após o teste preliminar para definição da faixa letal da amônia, seguiu-se com o teste definitivo para a estimativa das concentrações letais medianas (CL_{50}) em 24, 48, 72 e 96 h, bem como o cálculo do nível de segurança para a amônia.

O teste de toxicidade aguda foi realizado em 20 tanques de polietileno com volume útil de 100 L e volume adotado de 80 L. Nove concentrações de amônia, em duplicata, foram testadas: $8,16 \pm 0,56$ mg/L N-AT (nitrogênio na forma de amônia total), $0,42 \pm 0,03$ mg/L N-NH₃ (nitrogênio na forma de amônia não ionizada); $18,54 \pm 2,50$ mg/L N-AT, $0,87 \pm 0,18$ mg/L N-NH₃; $36,02 \pm 0,19$ mg/L N-AT, $1,52 \pm 0,25$ mg/L N-NH₃; $70,50 \pm 3,05$ mg/L N-AT, $2,00 \pm 0,21$ mg/L N-NH₃; $132,20 \pm 5,22$ mg/L N-AT, $3,77 \pm 0,46$

mg/L N-NH₃; 94,20± mg/L N-AT, 5,52±0,63 mg/L N-NH₃; 92,58±2,36 mg/L N-AT, 5,02±0,50 mg/L N-NH₃; 222,32± mg/L N-AT, 8,43± mg/L N-NH₃; 267,08 mg/L N-AT, 8,71±0,06 mg/L N-NH₃ com uma réplica, somadas à condição controle, também em duplicata. Os tratamentos foram obtidos a partir de solução estoque de 60 g/L N-AT, proveniente do cloreto de amônio (NH₄Cl) SIGMA[®]. Doze peixes com comprimento médio de 12,76 ± 1,24 cm e peso de 34,07 ±10,42 g foram usados em cada tratamento, sendo mantidos em jejum, com o intuito de se preservar os meios experimentais.

Os tratamentos testados nos diferentes tanques foram definidos de forma inteiramente casualizada. As unidades experimentais foram mantidas emersas em dois tanques de 7000 L, sendo aquecidas por meio de banho termostatizado.

A partir das mortalidades, a cada 24 h, foram estimadas as CL₅₀ de 24 a 96 h (Hamilton et al., 1977) e o nível de segurança (NS) proposto por Sprague (1971).

Finalizado o teste letal de 96 h de exposição, deu-se sequência ao teste subcrônico com os animais que sobreviveram nas concentrações testadas de amônia. Nesta etapa, 12 animais por concentração foram mantidos durante 8 dias, sendo expostos às concentrações de 8,16 ±0,56 mg/L N-AT, 0,42 ±0,03 mg/L N-NH₃; 18,54±2,50 mg/L N-AT, 0,87±0,18 mg/L N-NH₃; 36,02±0,19 mg/L N-AT, 1,52±0,25 mg/L N-NH₃; 70,50±3,05 mg/L N-AT, 2,00±0,21 mg/L N-NH₃; 132,20± 5,22 mg/L N-AT, 3,77±0,46 mg/L N-NH₃, mais a condição controle (tudo duplicata). As variáveis físico-químicas da água foram mantidas tais como na fase de curta duração. Os animais foram alimentados durante essa fase com ração extrusada da marca LAGUNA, para peixes onívoros (PB: 36%; E.E.: 7%; fibra bruta: 4%; matéria mineral: 20%; umidade: 8%; vitamina C: 500 mg/Kg), fornecida 2 vezes ao dia até a saciedade aparente.

Durante os testes agudo e subcrônico, os animais que demonstravam estar no fim da fase agônica, apresentando ausência de movimentos somáticos e do reflexo de fuga, assim como, permanência em decúbito lateral e constantemente no fundo do tanque, foram retirados, contabilizados e destinados ao estudo de biomarcadores. Nesta etapa do teste, antes das renovações, as concentrações de amônia foram monitoradas e 50% dos meios experimentais foram renovados diariamente.

Período de desintoxicação

Ao término da fase subcrônica deu-se início ao período de desintoxicação com os animais remanescentes (2 do controle, 2 do tratamento 8,16 ±0,56 mg/L N-AT, 0,42 ±0,03 mg/L N-NH₃ e 3 do tratamento 18,54±2,50 mg/L N-AT, 0,87±0,18 mg/L N-NH₃,

tratamentos subletais, em duplicata). Nessa etapa, os meios experimentais foram 100% renovados com água livre de amônia e esse procedimento se repetiu durante 4 dias, a cada 24 h, com o intuito de promover a desintoxicação dos animais ora expostos à amônia. A coleta de peixes para a amostragem biológica ocorreu apenas ao término do experimento.

Variáveis físico-químicas

Os parâmetros de qualidade de água no experimento agudo e nas etapas subcrônica e de desintoxicação foram monitorados e mantidos de acordo com o ideal para a tilápia. A cada 24 h foram coletados os dados referentes ao pH, temperatura, salinidade e condutividade com o auxílio do peagâmetro Combo ($\pm 0,05$) Hanna (modelo HI 98130). O pH foi mantido na faixa de 7,09 e 7,96, enquanto a temperatura, controlada por meio de aquecedores com termostatos, foi mantida na faixa de 25,15 e 27,95°C nos testes agudo, subcrônico e de desintoxicação.

O fotoperíodo foi mantido em 12 h e o oxigênio foi provido por meio de aeradores portáteis, sendo que as concentrações no teste agudo, subcrônico e de desintoxicação variou entre 5,08 e 7,72 mg/L nos diferentes testes. Os parâmetros de oxigênio foram monitorados com o oxímetro da Hanna (modelo HI 9146).

As concentrações de amônia, nas diferentes etapas da pesquisa, foram verificadas por meio de análise dos meios experimentais. Amostras de 100 mL de água de cada repetição e controles foram obtidas, sendo adicionados 2 mL de solução de ISA (Orion), seguido por agitação em agitador magnético (Hanna, HI 190M). Posteriormente, a leitura de AT foi feita com o auxílio de um eletrodo de íon seletivo, conectado a um peagâmetro de bancada (Hanna, HI 2211). Já para a estimativa da amônia não ionizada (N-NH₃), foi utilizado o método descrito por Whitfield (1974), modificado por Ostrensky et al. (1992), compreendendo o pH, temperatura, salinidade e a concentração total de amônia dos diferentes tratamentos.

Análise bioquímica e hematológica

Os peixes coletados nas etapas de intoxicação e desintoxicação tiveram o sangue retirado por meio de punção cardíaca (acesso ventral), com o uso de seringa hipodérmica, previamente heparinizada. Logo após, os animais foram sacrificados por meio de secção da medula, com retirada das brânquias para posterior análise.

O sangue retirado dos animais foi transferido para microtubos da marca eppendorf de 1,5 mL, com o anticoagulante heparina, a 10% do volume do sangue coletado. Do total

de sangue coletado, uma alíquota de 4 µL foi destinada à análise de hemoglobina (HB) por reação de cianometahemoglobina, com kit comercial (Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brasil). Ainda a partir do sangue total, um tubo capilar foi preenchido a 2/3 para análise de hematócrito (HT), que foi processado em centrífuga de microhematócrito (Laborline, Micro-spin), a 10.000 rpm por 5 minutos.

O sangue restante foi então centrifugado (centrifuga Mikro120, Hettich) a 10 rpm por 1 minuto e 30 rpm por 4 minutos. Por fim, o plasma foi coletado e transferido para microtubos de 0,5 mL e analisado em aparelho Cobas Mira-Plus-Roche[®] (Roche Diagnostic Systems) para detecção dos valores de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FOAL), glicose (GLIC), albumina (ALB), proteínas totais (PROT), ureia (URE), creatinina (CREA), com os respectivos kits de análises laboratoriais da SINERMED[®], e lactato (LAC) com kit de análise laboratorial da BIOCLIN[®].

Análises histológicas

Os tecidos amostrados foram fixados em solução Bouin durante 12 h, sendo em seguida transferidos para etanol 70%. Após a fixação dos tecidos, foram procedidos a desidratação, a diafanização, o emblocamento em parafina para posterior realização de cortes em micrótomo (Leica RM 2235) e coração por hematoxilina e eosina. Posteriormente à confecção das lâminas histológicas, foram geradas imagens das mesmas por meio do microscópio Leica (DM 4000 B), acoplado a um microcomputador.

Três lâminas com fragmentos de brânquias de 3 peixes de cada tratamento dos diferentes testes foram analisadas. A partir dessas informações foi feita uma descrição do grau de acometimento de brânquias em cada concentração de amônia dos testes agudo, subcrônico e de desintoxicação.

A classificação das lesões observadas nas brânquias foi feita de acordo com o proposto por Bernet et al. (1999): (1) importância patológica mínima, onde o dano é reversível após o término da exposição ao tóxico; (2) importância patológica moderada, onde a lesão é reversível em alguns casos após o término da exposição; e (3) importância patológica grave, onde a lesão é tipicamente irreversível e leva à perda parcial ou total da função orgânica. Todas as lesões foram avaliadas usando uma escala variando de: 0 = inalterada, 2 = ocorrência leve, 4 = ocorrência moderada e 6 = ocorrência grave. Os valores intermediários 1, 3 e 5 também foram considerados. Todas as avaliações foram realizadas por um único avaliador.

Utilizando o fator de importância e o valor de pontuação, o índice de lesão branquial (IG) foi calculado como: $I_G = \sum_{rp} \sum_{alt} (aw)$. Onde, rp = padrão de reação, alt = alteração, a = pontuação, w = fator de importância.

O índice atual representa o grau de lesão branquial e quanto maior o índice, maior o dano tecidual.

Análise estatística

As CL₅₀ de amônia foram estimadas a partir dos dados de mortalidade a cada 24 h, por meio do programa “Trimmed Spearman Karber” (Hamilton et al., 1977) e o nível de segurança foi obtido de acordo com Sprague (1971). Os dados bioquímicos, hematológicos (dos animais) e as variáveis físico-químicas dos meios ambientais dos testes de toxicidade aguda, subcrônica e de desintoxicação foram comparados por ANOVA unidirecional, seguido pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). Para as referidas análises foi utilizado o programa Statistical Analysis System (SAS Institute, version 8.0). Como pré-requisito da ANOVA, os dados foram submetidos à avaliação de normalidade (Cramer-von Mises) e homocedasticidade das variâncias (Levene's).

5.3 RESULTADOS

Parâmetros de qualidade de água

O valor médio do pH para os testes de toxicidade com amônia foi de $7,63 \pm 0,21$. Não houve diferenças significativas referentes aos valores de pH nos testes agudo, subcrônico e de desintoxicação. Os dados médios de temperatura, condutividade e salinidade para os referidos testes foram respectivamente de: $26,7 \pm 0,87^\circ\text{C}$; $1,08 \pm 1,38 \mu\text{S/cm}$; $0,43 \pm 0,25\%$.

Testes de toxicidade aguda da amônia

O teste de toxicidade aguda da amônia permitiu estimar a CL₅₀ para 24, 48, 72 e 96 h, cujos valores respectivos foram 133,29; 124,58; 113,52 e 112,57 mg/L N-AT; 6,08; 5,32; 4,42 e 4,35 mg/L N-NH₃, respectivamente. Os níveis de segurança foram calculados de acordo com Sprague (1971) e os valores estimados foram os seguintes: 11,26 mg/L N-AT e 0,44 mg/L N-NH₃.

No decorrer das 96 h de exposição à amônia foram constatadas alterações hematológicas nos animais dos diferentes tratamentos. Os parâmetros médios de lactato,

ALT, AST, glicose e ureia foram maiores nas concentrações mais elevadas em comparação ao controle ($P < 0,05$). Com relação ao hematócrito, hemoglobina, FOAL, albumina, proteínas totais e creatinina não foram encontradas diferenças significativas comparadas à condição controle. Os parâmetros referidos e seus respectivos valores são apresentados na tabela 1.

Teste de toxicidade subcrônica e desintoxicação

Foram observadas mortalidades durante o teste de exposição subcrônica à amônia, diferente do período de desintoxicação, no qual nenhum dos animais que passou para essa etapa veio a óbito. Os níveis de lactato, embora os valores não sejam significativos (ns), diminuíram nos tratamentos 1,52, 2 e 3,77 mg/L de N-NH₃ em relação ao controle, no teste subcrônico com amônia (Tabela 2). Diferente do que ocorreu na etapa de desintoxicação, onde o lactato foi superior na concentração 0,87 mg/L N-NH₃ (ns), enquanto o tratamento 0,42 mg/L N-NH₃ foi semelhante ao controle (ns) (Tabela 3).

Tabela 1. Média (\pm DP) dos parâmetros sanguíneos de *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição aguda à amônia

Parâmetros	Concentrações de amônia (mg/L N-NH ₃)																													
	0,14 mg/L (C)			0,42 mg/L			0,87 mg/L			1,52 mg/L			2 mg/L			3,77 mg/L			5,52 mg/L			5,02 mg/L			8,43 mg/L			8,71 mg/L		
HT (%)	21,25	\pm 1.06	ns	22,63	\pm 0.53	ns	14,80	\pm 0.28	ns	21,63	\pm 2.65	ns	19,63	\pm 2.30	ns	18,25	\pm 1.06	ns	23,58	\pm 0.95	ns	22,42	\pm 1.53	ns	24,49	\pm 1.01	ns	23,95	\pm 0.25	ns
HB (g/dL)	3,99	\pm 0.63	ns	3,89	\pm 0.81	ns	3,79	\pm 0.26	ns	4,29	\pm 0.37	ns	3,40	\pm 0.47	ns	3,91	\pm 0.52	ns	5,28	\pm 0.59	ns	6,41	\pm 0.79	ns	2,65	\pm 0.24	ns	3,73	\pm 1.06	ns
LAC (mmol/L)	11,18	\pm 0.16	a	14,46	\pm 1.45	a	13,74	\pm 2.01	a	12,74	\pm 0.76	a	11,77	\pm 0.87	a	13,53	\pm 1.98	a	70,00	\pm 3.44	bc	90,63	\pm 17.17	cd	36,83	\pm 7.09	ab	45,82	\pm 9.35	b
FOAL (UI/L)	40,67	\pm 4.80	ns	35,61	\pm 4.92	ns	36,59	\pm 7.50	ns	40,31	\pm 2.54	ns	39,90	\pm 2.15	ns	46,35	\pm 0.46	ns	36,26	\pm 1.43	ns	36,81	\pm 2.24	ns	35,40	\pm 7.18	ns	44,02	\pm 3.70	ns
ALT (UI/dL)	8,38	\pm 0.69	a	13,07	\pm 1.30	abc	13,01	\pm 3.24	abc	11,14	\pm 0.47	abc	9,94	\pm 0.82	ab	27,57	\pm 0.66	cd	73,82	\pm 6.19	e	67,10	\pm 6.25	e	25,57	\pm 5.48	bcd	34,92	\pm 7.35	d
AST (UI/L)	107,05	\pm 3.82	ab	66,04	\pm 14.29	a	206,93	\pm 91.64	abc	184,66	\pm 14.33	abc	120,56	\pm 22.90	ab	135,88	\pm 31.73	ab	359,08	\pm 2.78	c	238,43	\pm 72.28	abc	209,73	\pm 6.27	abc	269,79	\pm 74.35	bc
GLIC (mg/dL)	20,54	\pm 1.21	a	23,53	\pm 1.85	a	26,73	\pm 1.36	a	38,05	\pm 7.68	a	30,99	\pm 2.79	a	50,64	\pm 0.54	a	84,53	\pm 46.89	ab	46,98	\pm 4.31	a	138,16	\pm 24.42	b	152,01	\pm 33.91	b
ALB (g/dL)	0,51	\pm 0.11	ns	0,48	\pm 0.06	ns	0,56	\pm 0.17	ns	0,55	\pm 0.02	ns	0,46	\pm 0.02	ns	0,78	\pm 0.01	ns	0,47	\pm 0.04	ns	0,51	\pm 0.02	ns	0,50	\pm 0.05	ns	0,43	\pm 0.04	ns
PROT (g/dL)	2,28	\pm 0.23	ns	2,25	\pm 0.06	ns	2,41	\pm 0.39	ns	1,84	\pm 0.11	ns	2,14	\pm 0.41	ns	2,69	\pm 0.02	ns	2,36	\pm 0.09	ns	2,87	\pm 0.54	ns	1,95	\pm 0.04	ns	2,27	\pm 0.15	ns
URE (mg/L)	5,43	\pm 0.75	a	5,69	\pm 0.68	a	5,27	\pm 1.28	a	7,61	\pm 0.38	a	8,44	\pm 0.10	a	14,61	\pm 2.06	ad	43,54	\pm 10.51	c	36,83	\pm 2.49	bc	24,18	\pm 0.64	bd	30,79	\pm 2.01	bc
CREA (mg/dL)	0,31	\pm 0.03	ns	0,43	\pm 0.01	ns	0,25	\pm 0.01	ns	0,35	\pm 0.01	ns	0,23	\pm 0.04	ns	0,51	\pm 0.01	ns	0,36	\pm 0.07	ns	0,26	\pm 0.12	ns	0,27	\pm 0.06	ns	0,44	\pm 0.11	ns

As médias seguidas pela mesma letra horizontalmente não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$) para diferentes concentrações (ANOVA). ns significa não significativo em comparação com o tratamento de controle (C). Nota: HT. hematócrito; HB. hemoglobina; LAC. lactato; FOAL. fosfatase alcalina; ALT. Alanina aminotransferase; AST. Aspartato aminotransferase; GLI. glicose; ALB. Albumina; PROT. proteína total; URE. ureia; CREA. creatinina.

Tabela 2. Média (\pm DP) dos parâmetros sanguíneos de *Oreochromis niloticus* no teste de toxicidade subcrônica para amônia

Parâmetros	Concentrações de amônia (mg/L N-NH ₃)											
	0,14 mg/L (C)		0,42 mg/L		0,87 mg/L		1,52 mg/L		2 mg/L		3,77 mg/L	
HT (%)	27,25 \pm 1.06	ns	29,92 \pm 1.53	ns	29,63 \pm 0.88	ns	24,58 \pm 0.25	ns	24,58 \pm 1.17	ns	18,57 \pm 2.02	ns
HB (g/dL)	6,28 \pm 0.54	ns	6,13 \pm 0.66	ns	4,98 \pm 0.03	ns	6,72 \pm 0.36	ns	6,56 \pm 1.51	ns	8,93 \pm 0.50	ns
LAC (mmol/L)	60,49 \pm 1.33	ns	59,71 \pm 1.80	ns	56,48 \pm 3.47	ns	23,94 \pm 0.28	ns	24,57 \pm 0.92	ns	15,55 \pm 10.58	ns
FOAL (UI/L)	34,65 \pm 3.60	ns	34,61 \pm 0.48	ns	33,55 \pm 3.86	ns	37,53 \pm 1.30	ns	37,67 \pm 5.86	ns	35,54 \pm 6.71	ns
ALT (UI/dL)	13,39 \pm 4.40	ns	13,37 \pm 2.19	ns	13,57 \pm 3.36	ns	13,46 \pm 3.41	ns	8,17 \pm 0.59	ns	20,72 \pm 0.68	ns
AST (UI/L)	194,32	ns	97,75 \pm 29.37	ns	248,84 \pm 22.23	ns	146,56 \pm 40.38	ns	79,90 \pm 13.74	ns	178,81 \pm 38.89	ns
GLIC (mg/dL)	28,41 \pm 3.60	ns	24,44 \pm 0.74	ns	30,38 \pm 10.74	ns	27,27 \pm 4.21	ns	26,07 \pm 1.34	ns	31,41 \pm 3.78	ns
ALB (g/dL)	0,71 \pm 0.03	ns	0,58 \pm 0.05	ns	0,70 \pm 0.03	ns	0,65 \pm 0.04	ns	0,66 \pm 0.03	ns	0,51 \pm 0.16	ns
PROT (g/dL)	2,83 \pm 0.04	ns	2,65 \pm 0.15	ns	2,90 \pm 0.11	ns	2,69 \pm 0.02	ns	2,79 \pm 0.04	ns	2,29 \pm 0.49	ns
URE (mg/L)	5,00 \pm 0.75	ns	4,77 \pm 0.93	ns	4,32 \pm 0.51	ns	4,58 \pm 1.43	ns	4,60 \pm 0.04	ns	9,25 \pm 4.15	ns
CREA (mg/dL)	0,35 \pm 0.07	ns	0,20 \pm 0.04	ns	0,25 \pm 0.03	ns	0,45 \pm 0.28	ns	0,21 \pm 0.02	ns	0,30 \pm 0.04	ns

NS significa não significativo em comparação com o tratamento de controle (C). Nota: HT. hematócrito; HB. hemoglobina; LAC. lactato; FOAL. fosfatase alcalina; ALT. Alanina aminotransferase; AST. Aspartato aminotransferase; GLI. glicose; ALB. Albumina; PROT. proteína total; URE. ureia; CREA. creatinina.

Tabela 3. Média (\pm DP) dos parâmetros sanguíneos de *Oreochromis niloticus* após o teste de desintoxicação para amônia

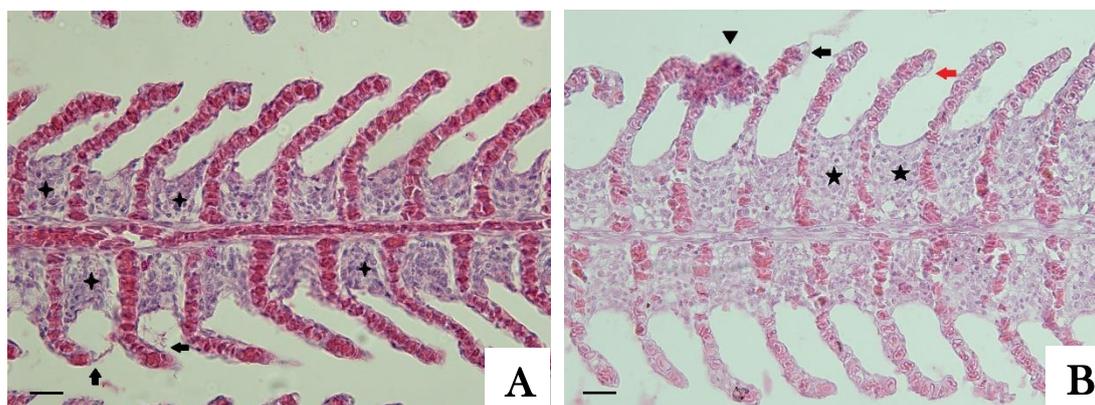
Parâmetros	Concentrações de amônia (mg/L N-NH ₃)								
	0,14 mg/L (C)			0,42 mg/L			0,87 mg/L		
HT (%)	25,00	\pm 0.71	ns	23,00	\pm 0.71	ns	21,17	\pm 0.24	ns
HB (g/dL)	4,900	\pm 0.31	ns	1,825	\pm 0.15	ns	6,34	\pm 0.29	ns
LAC (mmol/L)	5,08	\pm 1.04	ns	2,45	\pm 0.93	ns	20,26	\pm 5.12	ns
FOAL (UI/L)	29,62	\pm 1.54	ns	37,78	\pm 4.19	ns	32,03	\pm 4.74	ns
ALT (UI/dL)	11,69	\pm 3.46	ns	31,43	\pm 9.70	ns	30,67	\pm 4.92	ns
AST (UI/L)	243,08	\pm 41.38	ns	233,28	\pm 51.98	ns	313,11	\pm 3.25	ns
GLIC (mg/dL)	23,40	\pm 6.14	ns	30,24	\pm 4.63	ns	72,66	\pm 9.10	ns
ALB (g/dL)	0,48	\pm 0.01	ns	0,63	\pm 0.01	ns	0,51	\pm 0.06	ns
PROT (g/dL)	2,45	\pm 0.07	ns	2,69	\pm 0.06	ns	2,32	\pm 0.12	ns
URE (mg/L)	3,26	\pm 0.10	ns	2,56	\pm 0.30	ns	4,90	\pm 1.00	ns
CREA (mg/dL)	0,18	\pm 0.04	ns	0,19	\pm 0.002	ns	0,15	\pm 0.01	ns

NS significa não significativo em comparação com o tratamento de controle (C). Nota: HT. hematócrito; HB. hemoglobina; LAC. lactato; FOAL. fosfatase alcalina; ALT. Alanina aminotransferase; AST. Aspartato aminotransferase; GLI. glicose; ALB. Albumina; PROT. proteína total; URE. ureia; CREA. creatinina.

Tanto no teste de exposição subcrônico (Tabela 2), quanto na etapa de desintoxicação (Tabela 3), não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados.

Observações histológicas

A análise histopatológica revelou alterações nas brânquias dos animais expostos a amônia nos testes agudo (96 h), subcrônico (8 dias) e nos animais do período de desintoxicação (4 dias). A figura 1 A mostra a estrutura normal da brânquia de animais do grupo controle, onde pode ser visto a arquitetura típica com lamelas secundárias separadas. É possível perceber a ocorrência de hiperplasia leve e descolamento do epitélio.



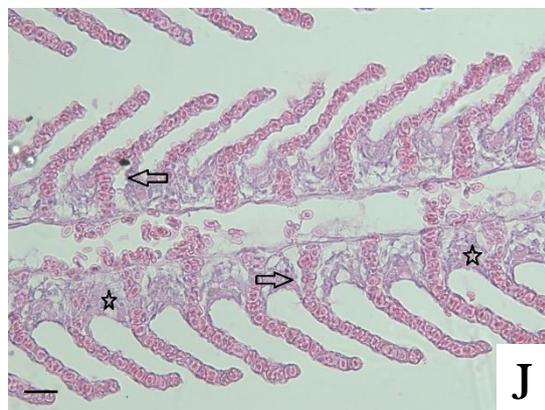
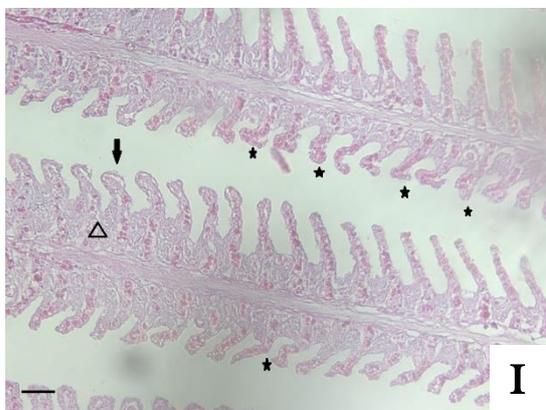
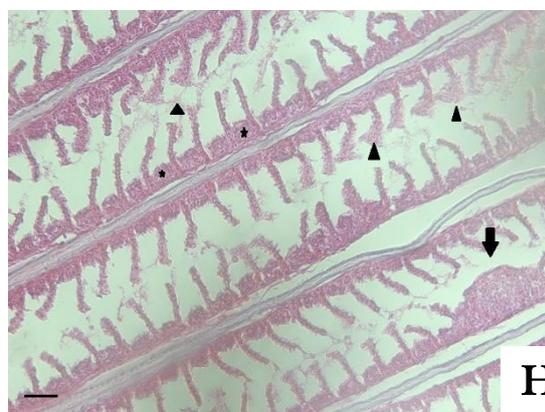
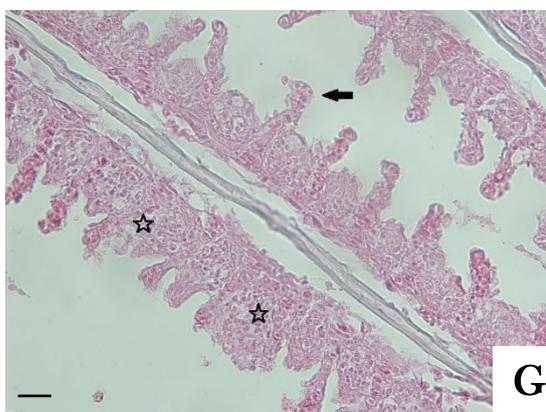
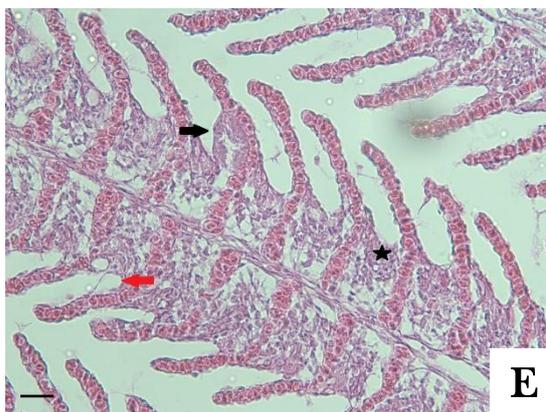
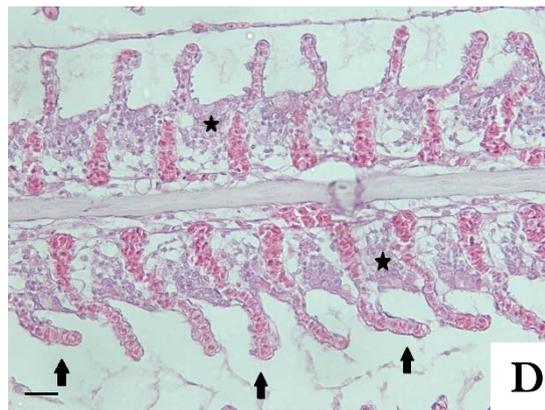
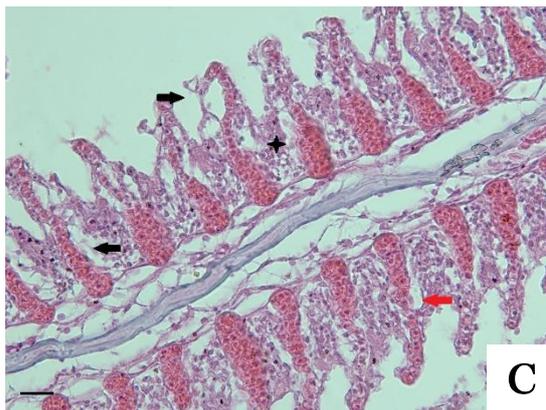


Figura 1. Fotomicrografia de brânquias de tilápias após exposição aguda (96 h) à amônia. (A) Tratamento controle apresentando hiperplasia leve (estrelas) e descolamento do epitélio lamelar (setas). (B) Aneurisma (cabeça de seta), descolamento do epitélio na ponta da lamela (seta preta), edema (seta vermelha) e hiperplasia (estrelas), em 0,42 mg/L N-NH₃. (C) Descolamento severo do epitélio respiratório (setas pretas), edema (seta vermelha) e hiperplasia (estrela), em 0,87 mg/L N-NH₃. (D) Perda da estrutura lamelar (setas pretas) e hiperplasia (estrela), em 1,52 mg/L N-NH₃. (E) Aneurisma (seta preta), descolamento do epitélio respiratório (seta vermelha) e hiperplasia (estrela), em 2,00 mg/L N-NH₃. (F) Lamelas tortuosas apresentando severa perda da estrutura (setas pretas), hiperplasia (seta vermelha) e descolamento do epitélio respiratório (cabeça de seta), em 5,52 mg/L N-NH₃. (G) Necrose (seta preta) e hiperplasia com fusão lamelar completa (estrela), em 8,43 mg/L N-NH₃. (H) Fusão lamelar (seta preta), aneurisma (cabeça de seta) e hiperplasia (estrelas), em 8,71 mg/L N-NH₃. (I) Descolamento do epitélio respiratório (seta preta), lamelas secundárias tortuosas apresentando severa perda da estrutura (estrelas) e hiperplasia com fusão das lamelas (cabeça de seta), em 5,52 mg/L N-NH₃. (J) Descolamento do epitélio lamelar (setas pretas) e hiperplasias (estrelas), em 5,52 mg/L N-NH₃; barra = 300 µm.

A histopatologia dos animais expostos à amônia no teste agudo apontou graves lesões em todos os tratamentos, porém com maior intensidade nas concentrações mais elevadas. Hiperplasia com perda da estrutura lamelar, lamelas tortuosas com severa perda da estrutura e necrose foram lesões encontradas nas concentrações 0,42; 0,87; 1,52; 2; 3,77; 5,52; 8,43 e 8,71 mg/L N-NH₃ (Fig. 1C, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J). Também foram encontradas lesões de menor gravidade e lesões consideradas leves, como: descolamento do epitélio, hiperplasia, aneurisma e edema em todas as concentrações referidas acima e evidenciadas nas figuras 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J.

Os animais do teste subcrônico seguiram apresentando lesões nas brânquias, semelhantes às encontradas nos animais do teste agudo, porém, em alguns casos, com maior severidade. Os tratamentos 0,42; 0,87; 1,52; 2; 3,77 mg/L N-NH₃, as brânquias apresentaram lesões como hiperplasia, fusão lamelar, perda da estrutura lamelar secundária e lesões de natureza leve como descolamento do epitélio respiratório e aneurisma que podem ser vistas nas figuras 2A, 2B, 2C e 2D.

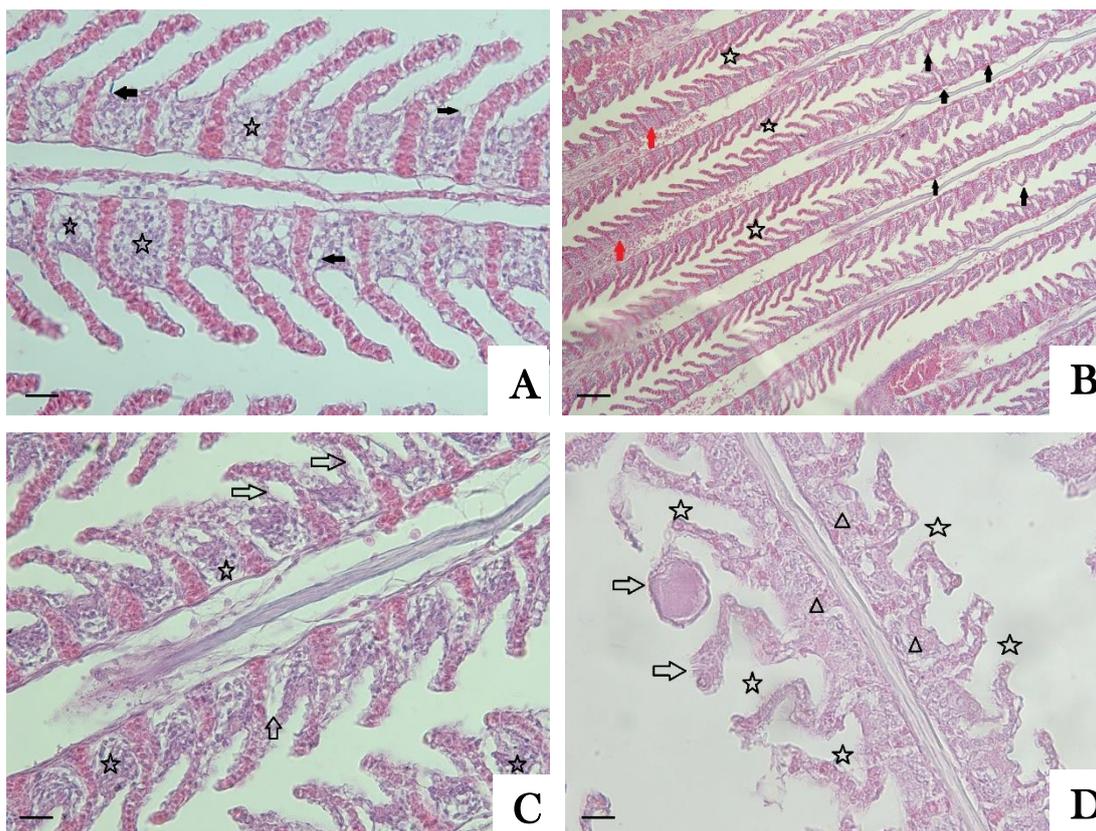


Figura 2. Fotomicrografia de brânquias de tilápias após exposição subcrônica (8 dias) à amônia. (A) Descolamento do epitélio respiratório na base da lamela (setas pretas) e hiperplasia (estrelas), em 0,87 mg/L N-NH₃. (B) Descolamento severo do epitélio respiratório (setas pretas), hiperplasia e hiperplasia (setas vermelhas), além de perda da estrutura lamelar (estrelas), em 1,52 mg/L N-NH₃. (C) Descolamento severo do epitélio lamelar (setas) e hiperplasia (estrelas), em 1,52 mg/L N-NH₃. (D) Aneurismas (setas), hiperplasia (cabeça de seta) e perda da estrutura lamelar, em 2,00 mg/L N-NH₃; barra 300 μ m.

O índice de brânquias (Tab. 4) também expressa os danos causados a este órgão pela exposição à amônia. Sendo os valores de pontuação dos índices crescentes, em função do aumento na concentração de amônia nos testes agudo, subcrônico e na etapa de desintoxicação, demonstrando o agravamento do estado das brânquias nos tratamentos mais elevados.

A histopatologia revelou ainda que houve recuperação nos tecidos de animais que passaram para a etapa de desintoxicação dos testes agudo e crônico. Embora algumas lesões como perda da estrutura das lamelas, hiperplasia leve, fusão lamelar e descolamento do epitélio lamelar tenham sido encontradas nos tratamentos 0,42 e 0,87 mg/L N-NH₃, as figuras 3A e 3B mostram que há um processo de recuperação das brânquias.

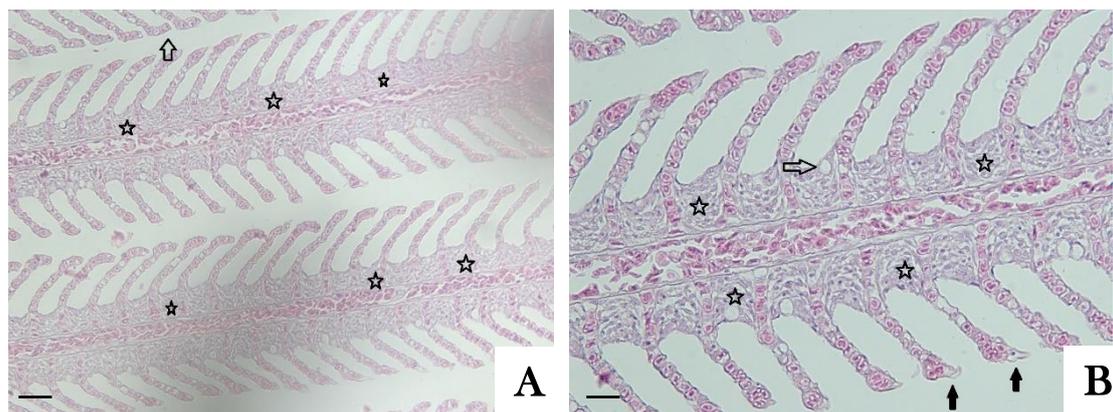


Figura 3. Fotomicrografia de brânquias de tilápias após o período de desintoxicação (4 dias). (A) Tortuosidade das lamelas com perda da estrutura (Seta preta) e hiperplasia leve (estrelas), em 0,87 mg/L N-NH₃. (B) Descolamento do epitélio lamelar e edema (setas pretas), hiperplasia (estrelas), células de cloreto (seta preta vazada) no tratamento 0,87 mg/L N-NH₃; barra 300 µm.

Tabela 4. Índices de lesões branquiais (IG) em juvenis de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* após exposição aguda (96 h), teste subcrônico (8 dias) e desintoxicação (4 dias).

Amônia (mg/L N-NH ₃)					
Agudo	I _G	Subcrônico	I _G	Desintoxicação	I _G
0,14	2	0,14	2	0,14	2
0,42	5,17	0,87	6	0,87	6
0,87	25,6	1,52	22,51		
1,52	22	2	43,67		
2	19,5	3,77	25		
3,77	39,32				
5,52	28,33				
8,43	60				
8,71	60				

5.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, os valores das CL₅₀₋₄₈ e 96h (5,32 e 4,35 mg/L N-NH₃, respectivamente) indicaram que os juvenis de tilápias do Nilo *O. niloticus* foram menos tolerantes à amônia do que animais da mesma espécie, porém de menor peso (10,11±0,045 g), submetidos ao teste de toxicidade aguda deste composto (Benli e Koksal, 2005). No referido trabalho, a CL_{50-48h} foi estimada em 7,40 mg/L N-NH₃, semelhante ao valor encontrado na CL_{50-48h} por (El-Sherif e El-Feky, 2008) (7,1 mg/L N-NH₃) com animais de 19,0±1,0 g. Diante do exposto acima, percebe-se que a tilápia possui maior tolerância ao NH₃ do que outras espécies de água doce como os ciprinídeos *Hypophthalmichthys*

molitrix, *Aristichthys nobilis* e *Carassius auratus gibelio* (0,35; 0,33 e 0,73, mg/L N-NH₃, respectivamente (CL₅₀-96h)) (Wang, 2017). Outras espécies de água doce também possuem uma tolerância à amônia inferior à da tilápia: como o pacu *Piaractus mesopotamicus* CL₅₀-96h= 0,014 mg/L N-NH₃ (Barbieri e Bondioli, 2015), o bagre do canal *Ictalurus punctatus* CL₅₀-96h= 0,5 mg/L N-NH₃ (Colt e Tchobanoglous, 1976), e o pacamã *Lophiosilurus alexandri* CL₅₀-96h= 3,66 mg/L N-NH₃ (Silva et al., 2018). A maior tolerância à amônia pela tilápia em comparação com outras espécies de peixes de água doce pode ser explicada pela sua exposição a este composto ao longo de várias gerações em ambientes adversos e de cativeiro, o que permitiu o desenvolvimento de características adaptativas morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Maina, 1999; Wilson, 1999).

Segundo Costa et al. (2008), o nível seguro de um determinado composto tóxico deve ser uma concentração tal que não cause qualquer prejuízo a sua saúde dos peixes. Sprague (1971) sugeriu que as concentrações de produtos tóxicos não devem exceder a 10% da toxicidade aguda estimada (CL₅₀-96h), a fim de se estabelecer limites de riscos relacionados a efeitos adversos provocados por esses compostos. Os valores obtidos no presente estudo relativos aos níveis de segurança confirmam o exposto por Sprague (1971), uma vez que os parâmetros hematológicos de animais expostos ao teste crônico não apresentaram alterações para esses valores de amônia, sendo assim, considerados seguros.

O lactato e a glicose são metabólitos de energia que sofrem elevações na circulação de peixes submetidos a diferentes tipos de estressores e, dessa forma, são parâmetros frequentemente utilizados para indicar possíveis situações de estresse (Das et al., 2004; Sopinka et al., 2016; Silva et al., 2018). Ao utilizar esses biomarcadores em nossos estudos, verificamos coerência com o exposto acima. Os valores de glicose foram significativamente superiores ao controle nos tratamentos 8,43 e 8,71 mg/L N-NH₃ no teste agudo. Da mesma forma, o lactato foi elevado nos tratamentos 5,52; 5,02; 8,71 mg/L N-NH₃ no mesmo teste. A hiperglicemia decorre do aumento da glicogenólise, conversão do glicogênio do fígado em glicose (Das et al., 2004; Kim et al., 2017), que por sua vez é desencadeada por catecolaminas produzidas em função do estímulo estressante (Mommsen et al., 1992; Chen et al., 2002). Shaffi (1980) também encontrou valores elevados de lactato e glicose sérica ao submeter nove diferentes espécies de peixes à amônia (1 a 4 mg/L de N-NH₃), quando comparados ao tratamento controle. Porém, peixes submetidos ao estresse também provocado pela amônia na mais elevada

concentração testada não tiveram alterações significativas (Schram, 2014), indicando que o animal estava tão intoxicado que não foi mais capaz de responder aos estímulos.

Foi identificado no plasma sanguíneo de animais expostos à amônia não ionizada nos tratamentos 5,52; 5,02; 8,43 e 8,71 mg/L N-NH₃ do teste de toxicidade aguda um aumento significativo de ureia. Tal fato é provavelmente resultado de um mecanismo de defesa contra a intoxicação por amônia por meio do ciclo da ornitina (ou ureia) (Ren et al., 2016). Em situações normais esse mecanismo não é acionado na maioria dos teleosteos, uma vez que envolve um maior gasto energético, porém, em circunstâncias em que há gradientes elevados de amônia no ambiente, os peixes modificam o sistema de excreção, passando a produzir ureia, composto menos tóxico (Randall, 2002; Wang et al., 2000; Hegazi et al., 2010; Sinha et al., 2013). Essa estratégia também foi observada em circunstâncias laboratoriais controladas em que a carpa comum *Cyprinus carpio* foi submetida a elevadas concentrações de amônia (Peyghan, 2002). Este mecanismo é o que também permite a sobrevivência da tilápia do Lago Magadi no Quênia, que habita ambientes com elevados níveis de amônia em função do pH (Walsh, 1993).

A atividade de enzimas inespecíficas como AST e ALT constituem-se em eficientes indicadores de lesões em tecidos de peixes, uma vez que as membranas celulares danificadas se tornam mais permeáveis, liberando essas enzimas na corrente sanguínea e alterando os valores séricos normais (Peres et al., 2015; Sopinka et al., 2016). Essas alterações são frequentemente provocadas por exposição a compostos tóxicos, doenças e manejo estressante (Svoboda et al., 2001; Wagner e Congleton, 2004; Sopinka et al., 2016; Silva et al., 2018). Neste estudo constatamos um significativo aumento de AST e ALT nos tratamentos do teste agudo 5,52, 8,71; 3,77, 5,52, 5,02, 8,43 e 8,71 mg/L N-NH₃, respectivamente, que pode ter sido ocasionado pelas condições estressantes da exposição à amônia, devido ao aumento das demandas de energia (Lemarie et al., 1991) ou pelas lesões desenvolvidas no tecido hepático (Sinha et al., 2012; Silva et al., 2018).

As mortalidades ocorridas nos testes de toxicidade aguda e subcrônica no presente trabalho podem estar relacionadas às lesões branquiais desenvolvidas nas tilápias. Lesões como hemorragia, hiperemia, aneurisma, edema celular, descolamento do epitélio respiratório, atrofia, hiperplasia do epitélio respiratório, fusão parcial e total de lamelas secundárias e perda da estrutura das lamelas secundárias foram identificadas nos animais expostos à amônia nos testes agudo subcrônico.

A conformação estrutural da brânquia é de grande relevância ao se estudar os efeitos da exposição à amônia, uma vez que este órgão é o primeiro a ter contato com os

contaminantes presentes na água e também está envolvido com o processo de desintoxicação (Randall e Tsui, 2002). Uma ferramenta frequentemente utilizada na histopatologia para avaliação da integridade das brânquias de animais expostos a contaminantes ambientais são os índices relacionados as suas eventuais lesões (Mallatt, 1985) e neste estudo foi possível verificar a intensidade da degradação promovida pela amônia neste órgão através da pontuação atingida.

O descolamento do epitélio respiratório é o primeiro indicativo de patologia na brânquia (Thophon et al., 2003). Essa alteração foi uma das mais frequentes em tilápias no presente estudo, juntamente com a hiperplasia, sendo caracterizada pelo afastamento de uma lâmina contínua do epitélio de revestimento das lamelas para longe das células pilares, aumentando a distância entre o meio externo e o sangue (Thophon et al., 2003). O descolamento do epitélio respiratório e a hiperplasia, que pode evoluir para fusão parcial ou total das lamelas, atuam como um mecanismo de defesa ao aumentar a barreira para diminuir a difusão do poluente (Erkmen e Kolankaya, 2000; Sepici-Dinçel et al., 2009), contudo, há um prejuízo sobre a troca gasosa e a capacidade de difusão através das brânquias, com conseqüente prejuízo à respiração, ao equilíbrio ácido-base, à osmorregulação e à excreção de compostos nitrogenados (Frances et al., 2000; Randall e Tsui, 2002). Alterações semelhantes às encontradas neste trabalho também foram observadas por Schram (2010), trabalhando com bagres africanos, e Silva et al. (2018) trabalhando com pacamãs, em ambos os casos, os animais foram submetidos a testes de toxicidade com amônia.

O aneurisma ou telangiectasia também foi uma lesão encontrada em tilápias nos testes agudo e subcrônico com amônia e está em conformidade com o que ocorreu com pacamãs submetidos à intoxicação com amônia (Silva et al., 2018). Esta lesão é tipicamente resultante do colapso de células pilares, com prejuízo da integridade vascular e o conseqüente fluxo de sangue que pressiona o epitélio para o exterior (Hinton e Laurén, 1990). Isso pode provocar a ruptura do epitélio e desencadear a hemorragia. Outra conseqüência que pode estar relacionada a esse processo é o inchaço e elevação das células branquiais, que podem promover o declínio da enzima Na^+/K^+ ATPase, causando prejuízos à osmorregulação dos peixes (Ahmed et al., 2013).

Como visto anteriormente, a exposição dos peixes a amônia aciona um mecanismo de defesa nas brânquias, cuja arquitetura se modifica com o intuito de diminuir a difusão do contaminante para o interior do organismo. Contudo, se o estímulo do estressor não cessar, o animal pode entrar em um quadro de hipóxia (Silva et al., 2018), onde o

organismo será comprometido diante da falta de oxigênio. Essa situação foi percebida em nossos testes com amônia, onde se notou alterações histopatológicas nas brânquias dos animais expostos às concentrações 5,52; 5,02 e 8,71 mg/L N-NH₃. O quadro de hipóxia foi confirmado pelo aumento do lactato ocorrido nas concentrações mencionadas. Nestes mesmos tratamentos, além do tratamento 8,43 mg/L N-NH₃, ocorreu um aumento na produção de ureia, que se deu em função da tentativa de evitar a intoxicação pela amônia (Randall e Tsui, 2002).

Embora os resultados da exposição subcrônica à amônia não tenham apresentado diferença significativa ($p > 0,05$), nota-se a diminuição dos níveis de lactato nos tratamentos 1,52; 2 e 3,77 mg/L N-NH₃ em relação à condição controle, diferente do que ocorreu no teste letal. Com relação à ureia, neste mesmo teste, os valores obtidos foram inferiores ao tratamento controle (ns), com exceção apenas do maior tratamento testado (3,77 mg/L N-NH₃). Esses resultados levam a crer que o organismo estava passando por um processo de adaptação ao meio rico em amônia, quando foram observadas as reduções nas concentrações de lactato e ureia ($p > 0,05$). Um sinal de reestabelecimento da homeostase também pôde ser percebido a partir da análise histopatológica das brânquias de animais do tratamento 0,87 mg/L N-NH₃, embora nas demais concentrações as alterações apresentavam-se inalteradas.

Segundo Bernet (1999), brânquias com lesões de natureza leve, de animais expostos a contaminantes ambientais podem vir a recuperar sua estrutura e a função caso haja melhoria nas condições ambientais. Este processo de recuperação também foi observado no presente trabalho. Tilápias do tratamento 0,42 mg/L N-NH₃ da etapa de desintoxicação apresentaram melhora nas características histológicas das brânquias ao ter seu ambiente renovado, isento de amônia. Os níveis de lactato e ureia também confirmam o reestabelecimento da homeostase, uma vez que ambos apresentaram valores iguais ao tratamento controle ($p > 0,05$). Situação diferente ocorreu com o tratamento 0,87 mg/L N-NH₃, que também alcançou a etapa de desintoxicação, porém apresentou níveis superiores ao controle com relação ao lactato e à ureia, indicando que os animais ainda estavam se recuperando do estresse. Os níveis de ALT e AST foram estatisticamente semelhantes ao controle nos tratamentos 0,42 e 0,87 mg/L N-NH₃, corroborando a interpretação de que os animais estavam se recuperando da intoxicação pela amônia. Situação adversa foi percebida por Silva et al. (2018) quando pacamãs se recuperavam do estresse provocado pela amônia, quando os mesmos foram mantidos em água livre deste composto nitrogenado.

5.5 CONCLUSÃO

Os juvenis de tilápia possuem elevada tolerância à amônia, sendo capazes de tolerar eventuais picos na concentração deste composto em ambientes de cultivos intensivos ou semi intensivos.

Os níveis de segurança foram considerados confiáveis para essa fase de desenvolvimento, pois esses valores de amônia não foram suficientes para provocar danos consideráveis aos animais expostos.

As alterações apontaram a ocorrência de modificações no metabolismo, ocasionadas pela necessidade de se mobilizar energia das reservas endógenas. A intoxicação por amônia desencadeou consequências metabólicas e prejuízos aos tecidos branquiais, especialmente nas concentrações mais elevadas, onde foram encontradas a maior parte das lesões irreversíveis.

A avaliação por meio da tolerância do animal à amônia, bem como o uso de biomarcadores histopatológicos e sanguíneos foram ferramentas comprovadamente eficientes na investigação quanto a potencialidade deste tóxico aos organismos, objeto deste estudo.

O processo de desintoxicação é possível e pode ser considerado eficiente na recuperação da homeostase, dado que foi constatado regeneração dos tecidos branquiais e restabelecimento dos parâmetros sanguíneos. Contudo, a desintoxicação é dependente do grau de degradação do organismo em função da intoxicação pela amônia.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, D.S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T., Ayyappan, S. 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58(2), 220-226.
- Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M.H., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S. 2013. Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Exp. Toxicol. Pathol.* 65, 903-909.
- Andrews, S. R., Sahu, N. P., Pal, A. K., Kumar, S. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquac. Res.* 41,61-69.
- Arias, R.L.A., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de

- impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciênc. Saúde Colet. 12, 61-72.
- Baldisserotto, B. 2016. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3ª Edição. Ed. UFSM, Santa Maria. 350 pp.
- Barbieri, E., Bondioli, C.V. 2015. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. Aquacult. Res. 46, 565-571.
- Benli, A.Ç.K., Koksall, G. 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae e fingerlings. Tur. J. Vet. Anim. Sci. 29, 339-344.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22, 25-34.
- Cardoso, E.L., Chiarini-Garcia, H., Ferreira, R.M.A., Poli, C.R., 1996. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. J. Fish Biol. 49, 778-787.
- Carmouze, J.P. 1994. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher/Fapesp. 253p.
- Chen, W., Sun, L., Tsai, L., Tsai, C., Song, Y., Chang, C. 2002. Cold-Stress Induced the Modulation of Catecholamines, Cortisol, Immunoglobulin M, and Leukocyte Phagocytosis in Tilapia. Gen. Comp. Endocrinol. 126, 90- 100.
- Chen, J.Z., Zhang, X.L., Hu, G.D., Qu, J.H., Fan, L.M., Song, C. 2011. The immune response of GIFT *Oreochromis niloticus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in different ammonia. Ecol. Environ. Sci. 20, 629-634.
- Cheng, C.H., Yang, F.F., Ling, R.Z., Liao, S.A., Miao, Y.T., Ye, C.X., Wang, A.L. 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). Aquat. Toxicol. 164, 61-71.
- Colt, J., Armstrong, D. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusc. In: Allen, L., Kinney, E. Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture. Fish Culture Section of the American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- Colt, J., Tchobanoglous, G. 1976. Evaluation of the short-term toxicity of nitrogenous compounds to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture. 8, 209-224.
- Costa, L.D.F., Miranda-Filho, K.C., Severo, M.P. 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. Aquaculture. 285, 270-272.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K., Das, B.K. 2004. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Aquacult Res. 35, 134-143.
- Diaz-Quiroz, J.F., Echeverri, K. 2013. Spinal cord regeneration: where fish, frogs and salamanders lead the way, can we follow? Biochem. J. 451(3), 353-364
- Di Marco, P., Priori, A., Finioia, M.G., Petochi, T., Longobardi, A., Donadelli, V., Marino, G. 2011. Assessment of blood chemistry reference values for cultured sturgeon hybrids (*Acipenser naccarii* female *Acipenser baerii* male). J. Appl. Ichthyol. 27, 584-590.

- El-Sherif, M.S., El-Feky, A.M. 2008. Effect of ammonia on Nile tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures. In: 8^o International Symposium on Tilapia In Aquaculture. p.513-529.
- Erkmen, B., Kolankaya, D. 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of Capoeta tinca living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 64, 418-425.
- Esteves, F.A. 1998. Fundamentos da limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 602p.
- Evans, J.J., Park, D., Brill, G.C., Klesius, P.H. 2006. Un-ionized Ammonia Exposure in Nile Tilapia: Toxicity, Stress Response, and Susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. Am J Aquacult N. 68, 23-33.
- Frances, J., Nowak, B.F., Allan, G.L. 2000. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture. 183, 95-103.
- Fu, C., Cao, Z.D., Fu, S.J. 2013. The effects of caudal fin loss and regeneration on the swimming performance of three cyprinid fish species with different swimming capacities. J. Exp. Biol. 216, 3164-3174.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11, 714-719.
- Hassan, B., El-Salhia, M., Khalifa, A., Assem, H., Al Basomy, A., El-Sayed, M. 2013. Environmental isotonicity improves cold tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Egypt. Egypt J Aquat Res. 39, 59-65.
- Hegazi, M.M., Attia, Z.I., Hegazi, M.A., Hasanein, S.S. 2010. Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain, Aquaculture. 299, 149-156.
- Hinton, D.E., Lauren, D.J. 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: S. M. ADAMS (Ed) Biological Indicators of Stress in Fish. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society Symposium. p.51-66.
- Kim, J., Park, H., Hwang, I., Han, J., Kim, D., Oh, C. W., Lee, J. Kang, J. 2017. Toxic effects of juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria* by ammonia exposure at different water temperature. Environ Toxicol Pharmacol. 54, 169- 171.
- Kochba, M., Diab, S., Avnimelech, Y. 1994. Modeling of nitrogen transformation in intensively aerated fish ponds. Aquaculture, 120, 95-104.
- Lemarie, P., Drai, P., Mathieu, A., Lemaire, S., Carriere, S., Giudicelli, S., Lafaurie, M. 1991. Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture. 93, 63-75.
- Love, R.M. 1980. The chemical biology of fishes, vol. 2: Advances 1968-1977. Academic Press, London, 943 pp.
- Maina, J.N. 2000. The highly specialized secretory epithelium in the buccal cavity of the alkalinity adapted Lake Magadi cichlid, *Oreochromis alcalicus grahami* (Teleostei: Cichlidae): a scanning and transmission electron microscope study. J. Zool. 251, 427-438.

- Maita, M. 2007. Fish health assessment. In: Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. H. Nakagawa, M. Sato and D. M. Gatlin (Eds). CAB International, Oxon, UK, pp. 10-34.
- Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630- 646.
- McDonald, D.G., Milligan, C.L. 1992. Chemical properties of the blood. In: Fish physiology. W. S. Hoar, D. J. Randall and A. P. Farrell (Eds). Academic Press, New York, pp. 55-133.
- Miranda-Filho, K.C., Costa, L.D.F. 2016. Deleterious effects of ammonia and nitrite to fish and crustaceans, chapter 26. In: Tavares-Dias, M., Mariano, W.S. (Eds.), *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. Vol. 2. São Carlos, Pedro & João Editores, pp. 545-578.
- Miranda-Filho, K.C., Pinho, G.L.L., Wasielesky, W.J., Bianchini, A. 2009. Long-term ammonia toxicity to pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 150, 377-382.
- Miron, D.S., Moraes, B., Becker, G.A., Crestani, M., Spanevello, R., Loro, V.L., Baldisserotto, B. 2008. Ammonia end pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) *Aquaculture* 277, 192-196.
- Mommsen, T.P., Danulat, E., Walsh, P.J. 1992. Metabolic actions of glucagon and dexamethasone in liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85, 316- 326
- Peakall, D.W. 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol.* 1, 55-60.
- Peres, H., Costas, B., Perez-Jimenez, A., Guerreiro, I., Oliva-Teles, A. 2015. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 65- 71.
- Perez-Jimenez, A., Peres, H., Cruz-Rubio, V., Oliva-Teles, A. 2012. The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comp. Biochem. Physiol.* 155C, 506- 516.
- Peyghan, R., Takamy, G.A. 2002. Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention. *Aquacult. Int.* 10, 317-325.
- Ostrensky, A., Marchiori, M.A., Poersch, L.H. 1992. Toxicidade aguda da amônia no processo produtivo de pós-larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 64(4), 383-389.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17- 23.
- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacean. *Biol. ver.* 62, 1-24.
- Ren, Q., Li, M., Yuan, L., Song, M., Xing, X., Shi, G., Meng, F., Wang, R. 2016. Acute ammonia toxicity in crucian carp *Carassius auratus* and effects of taurine on hyperammonemia. *Comp Biochem Physiol, Part C* 190, 9-14.

- Russo, R., 1985. Amônia, nitrite and nitrate. In: G. Rand e S. Petrocelli., (eds.), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Pub. Corp. New York, pp. 455-471.
- Sepici-Dinçel, A., Calan K.B.A., Selvi M., Sarikaya R., Sahin D., Ayhan Ozkul I., Erkoç, F. 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio L.*) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1433-1439.
- Schram, E., Roques, J.A.C., Wout Abbin, W., Spanings, T., Vries, P., Biermana, S., Vis, H., Flik, G. 2010. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African Catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 306, 108-115.
- Schram, E., Roques, J.A.C., Kuijk, T.V., Abbink, W., Heul, J.V., Vries, P., Biern, S., Vis, H., Flik, G. 2014. The impact of elevated water ammonia and nitrate concentrations on physiology, growth and feed intake of pikeperch (*Sander lucioperca*). Aquaculture 420-421, 95-104.
- Shaffi, S.A. 1980. Ammonia Toxicity: Metabolic Disorder In Nine Freshwater Teleosts. Toxicol. Lett. 6, 349-356.
- Silva, M.J.S., Costa, F.F.B., Leme, F.P., Takata, R., Costa, D.C., Mattioli, C.C., Luz, R.K., Miranda-Filho, K.C. 2018. Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. Sci. Total Environ. 616-617, 1566-1575.
- Sinha, A.K., Giblen, T., Elgawad, A., De Rop, H.M., Asard, H., Blust, R., De Boeck, G. 2013. Regulation of amino acid metabolism as a defensive strategy in the brain of three freshwater teleosts in response to high environmental ammonia exposure, Aquat. Toxicol. 130, 86-96.
- Sinha, A.K., Liew, H.J., Diricx, M., Blust, R., De Boek, G. 2012. The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in gold fish (*Carassius auratus L.*). Aquat. Toxicol. 109, 33- 46.
- Sopinka, N.M., Donaldson, M.R., O'Connor, C.M., Cooke, S.J. 2016. Stress Indicators In Fish, chapter 11. In: Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Cooke, S. J (Eds.), Biology of Stress in Fish, Volume 35. Elsevier, pp 400-459.
- Sprague, J.B. 1971. Measurement of pollutant to fish –III Sublethal effects and safe concentrations. Water Res. 5, 245-266,
- Svoboda, M., Kouril, J., Hamackova, J., Kalab, P., Savina, L., Svobodova, Z., Vykusova, B. 2001. Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca L.*) during pre- and post- spawning period. Acta Vet. Brno. 70, 259- 268.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. 2003. Histological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environm. Pollut. 121, 307-320.
- Vázquez, G.R., Guerrero, G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue Cell. 39, 151-160.

- Ventura, A.S., Corsini, E.F., Gabriel, A.M.A. 2015. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes. *Nutri Time, Revista Eletrônica* (<http://www.nutritime.com.br>) 12, Nº 06.
- Wagner, T., Congleton, J.L. 2004. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 61, 1066-1074
- Walsh, P.J., Bergman, H.L., Narahara, A., Wood, C. M., Wright, P.A., Randall, D.J., Maina, J. N., Laurent, P. 1993. Effects of Ammonia on Survival, Swimming and Activities of Enzymes of Nitrogen Metabolism in the Lake Magadi Tilapia *Oreochromis Alcalicus Grahami*. *J. exp. Biol.* 180, 323-387.
- Wang, Y.X., Walsh, P.J. 2000. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquat. Toxicol.* 50, 205-219.
- Wang, H., Xiao X., Wang, H., Li Y., Yu, Q., Liang, X., Feng, W., Shao, J., Rybicki, M., Jungmann, D., Jeppesen, E. 2017. Effects of high ammonia concentrations on three cyprinid fish: Acute and whole-ecosystem chronic tests. *Sci. Total Environ.* 598, 900-909.
- Wendt, C.A.G., Saunders, R.L. 1973. Changes in carbohydrate metabolism in young Atlantic salmon in response to various forms of stress. *Int. Atlantic Salmon Found. Spec. Pub. Ser.* 4, 55-82.
- Wilson, P.J., Wood, C.M., Maina, J.N., White, B.N. 2000. Genetic structure of Lake Magadi tilapia populations. *J Fish Biol.* 56, 590-603.
- Whitfield, M. 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea-water. A theoretical study. *J. Mar. Biol. Assoc.* 54(3), 565-580.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O notável crescimento da produção comercial de peixes, impulsionado por uma demanda ainda maior, começa a encontrar entraves. Problemas com disponibilidade e qualidade de água, necessidade de atendimento a regulações ambientais quanto ao limite de uso e a preocupação com biossegurança, por exemplo, são fatores que têm conduzido a produção de pescados para sistemas intensificados, como os sistemas de recirculação e de bioflocos, onde é possível ter maior controle da qualidade da água, e maior adensamento dos animais. Contudo, é típico destes sistemas, o acúmulo dos compostos nitrogenados amônia, nitrito e nitrato, sendo a primeira forma, a mais tóxica.

Os testes de toxicidade realizados neste trabalho mostraram que a tilápia possui uma elevada tolerância a amônia. Embora este composto tenha causado danos ao organismo dos animais em diversas concentrações, quando comparamos a CL₅₀ de amônia para os juvenis do presente estudo com peixes de outras espécies, confirmamos que a tilápia do Nilo possui mecanismos adaptativos que a favoreceu em ambientes

contaminados com esta substância. Esta tolerância é um aspecto positivo, altamente relevante para uma espécie de peixe ser cultivada em sistemas de produção intensivos.

Os estudos relativos a tolerância de organismos aquáticos a compostos nitrogenados são fundamentais e devem compor os estudos futuros relacionados a avaliação de potencialidades de novas espécies para a inclusão na aquicultura. As respostas preliminares de tais testes podem nortear a tomada de decisões e assim reduzir riscos no início da implantação de projetos aquícolas e em sua continuidade.