

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**DIFERENTES NÍVEIS DE DUREZA E AMÔNIA NA ÁGUA E SUAS
IMPLICAÇÕES NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO DO
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824)**

RICARDO LOUREGA PRATI

FURG
RIO GRANDE, RS.

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**DIFERENTES NÍVEIS DE DUREZA E AMÔNIA NA ÁGUA E SUAS
IMPLICAÇÕES NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO DO
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824)**

RICARDO LOUREGA PRATI

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio
Grande (FURG) como requisito
para a obtenção do título de
MESTRE.

Orientador:

Dr. Luciano de Oliveira Garcia

FURG
RIO GRANDE, RS.

2013

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus pela oportunidade de aqui estar e seguir meu caminho da melhor forma possível.

Agradecer à minha Mãe e ao Renato que mesmo distantes sempre estiveram enviando boas energias e torcendo muito pelo meu sucesso.

Ao meu Pai, que sempre esteve ao meu lado me fortalecendo, me apoiando e me dando condições de buscar meus objetivos, sei que para ti, também é a realização de um sonho, e você merece muito.

À toda minha família perto ou longe, muito obrigado por tudo, amo à todos vocês !!!

Gostaria de agradecer muito o apoio e o companheirismo da minha namorada Nati, em todos os bons e maus momentos que compartilhamos, juntos conseguimos enfrentar dificuldades e a saudade pela distância, o que nos faz hoje mais fortes e mais unidos,

Te amo muito !!!

Agradeço à todos os amigos e colegas que fiz por onde passei, que com seus conhecimentos, e mais importante que tudo, com a convivência e os bons momentos, me deixam muitas lembranças felizes para recordar.

Agradeço à Josi e a Cândida pela amizade e parceria durante o experimento, com a ajuda de vocês nosso trabalho foi possível.

Muito obrigado à Prof^ª Maria Amália Pavanato e ao Prof^º Bernardo Baldisseroto que abriram as portas dos seus laboratórios, e mais do que colegas, com certeza fiz amigos por lá. Muito obrigado gurias Isa, Giovana, Eti e Tanise por toda ajuda e paciência.

Agradeço à todos os Professores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura-FURG, que dividiram comigo seus conhecimentos. Em especial ao meu Prof^º Orientador e amigo Luciano de O. Garcia, que sempre me apoiou e me auxiliou no meu crescimento como estudante, sendo também compreensivo em momentos de necessidade ao longo dessa caminhada. Muito obrigado e um Forte Abraço à todos !!!

Índice

Resumo Geral	v
Abstract.....	vi
1. Introdução geral	1
1.1. Piscicultura.....	1
1.2. Jundiá – <i>Rhamdia quelen</i>	3
1.3. Amônia.....	5
1.4. Dureza.....	9
1.5. Estresse Oxidativo.....	11
2. Objetivos.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 1: Interaction of water hardness and ammonia levels in silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) juveniles and their influence on oxidative stress parameters.....	25
Conclusões Gerais.....	54

Resumo Geral

No presente estudo foram avaliados os efeitos de diferentes níveis de dureza (25 e 120 mg CaCO₃ L⁻¹) e amônia não-ionizada (0,02; 0,18 e 0,50 mg NH₃ L⁻¹) na água sobre parâmetros de estresse oxidativo em juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* por um período de cinco dias. Foram coletados fígado e brânquias dos animais, antes da exposição à amônia, 1 e 5 dias após a exposição para análise da lipoperoxidação (TBARS), glutathione transferase (GST) e catalase (CAT). Não foi observado influência dos níveis de dureza na mortalidade, porém os tratamentos com 0,50 mg NH₃ L⁻¹, em ambos níveis de dureza, atingiram mortalidade de 100% após 24 h. Os níveis de TBARS no fígado, foram significativamente maiores (89,8 %) no tratamento com 25 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0,18 mg NH₃ L⁻¹ em relação ao tratamento 120 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0,18 mg NH₃ L⁻¹ no 5º dia de exposição. Nas brânquias, o tratamento 25 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0,18 mg NH₃ L⁻¹ apresentou um acréscimo de 132,6% nos níveis de TBARS ao quinto dia quando comparado ao controle. Já os tratamentos 120 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0,02 e 0,18 mg NH₃ L⁻¹ apresentaram diminuição de 145,1 e 122,7 %, respectivamente, nos níveis de TBARS em relação ao controle. Ao quinto dia de exposição, os tratamentos com 25 mg CaCO₃ L⁻¹, em ambos níveis de amônia, apresentaram maiores níveis de TBARS em relação aos tratamentos com 120 mg CaCO₃ L⁻¹ em ambos níveis de amônia. A enzima CAT no fígado, apresentou uma diminuição (65,5 %) e um aumento (172,9 %) da sua atividade, ao quinto dia, nos tratamentos 25 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0,02 e 0,18 mg NH₃ L⁻¹, respectivamente quando comparados ao controle. Nas brânquias, a CAT apresentou maior atividade no tratamento 25 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0,18 mg NH₃ L⁻¹ quando comparado aos demais tratamentos (73,1; 104,5 e 150,3%). Ao quinto dia, a enzima GST apresentou um decréscimo na atividade em torno de 45%, no fígado dos animais expostos à 120 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0,18 mg NH₃ L⁻¹ quando comparado aos demais tratamentos. Os resultados demonstram que elevados níveis de dureza não são capazes de evitar a mortalidade em animais expostos à concentrações extremas de amônia não-ionizada, porém tem efeito benéfico melhorando o status oxidativo dos animais.

Abstract

In the present study we evaluated the effects of different levels of hardness (25 e 120 mg CaCO₃ L⁻¹) and un-ionized ammonia (0,02; 0,18 e 0,50 mg NH₃ L⁻¹) in water on oxidative stress parameters in juvenile catfish *Rhamdia quelen* for a period of five days. We collected liver and gills of animals, before exposure to ammonia, 1 and 5 days after exposure for analysis of lipid peroxidation (TBARS), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT). There was no influence of the hardness levels in mortality, however the treatments with 0,50 mg NH₃ L⁻¹, in both hardness levels, reached 100% mortality after 24 h. The liver TBARS levels, were significantly higher (89.8 %) in treatment with 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ regard to the treatment 120 mg CaCO₃ L⁻¹ - 0.18 mg NH₃ L⁻¹ on the 5th day of exposure. In the gills, the treatment 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ showed an increase of 132.6% in the TBARS levels on the fifth day when compared to control. Already treatments 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0,02 and 0,18 mg NH₃ L⁻¹ showed a decrease of 145.1 and 122.7%, respectively, in levels of TBARS compared to control. On the fifth day of exposure, the treatments with 25 mg CaCO₃ L⁻¹, in both levels of ammonia, showed higher levels of TBARS compared to treatments with 120 mg CaCO₃ L⁻¹ in both ammonia levels. The enzyme catalase in the liver, showed a decrease (65.5%) and an increase (172.9%) of its activity, on the fifth day, treatments 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 e 0.18 mg NH₃ L⁻¹, respectively, when compared to control. In the gills, the CAT showed greater activity in the treatment 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ when compared to the other treatments (73.1, 104.5 and 150.3%). On the fifth day, the GST enzyme showed a decrease in activity of approximately 45%, in the liver of animals exposed to 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ when compared to the other treatments. The results show that high levels of hardness are not able to prevent the mortality in animals exposed to extreme concentrations of un-ionized ammonia, however it has a beneficial effect improving the oxidative status of the animals.

1. Introdução Geral

1.1 Piscicultura

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), no ano de 2009 a China foi o maior produtor aquícola mundial com uma produção de aproximadamente 45,3 milhões de toneladas. Seguida da Indonésia e a Índia, que atingiram produção de cerca de 4,7 milhões e 3,8 milhões de toneladas, respectivamente. No ano de 2009 o Brasil atingiu a produção de 415.649 t ocupando a 17ª posição no ranking mundial.

Em 2010, a produção aquícola nacional foi de 479.399 t, indicando um crescimento de 15,3% em relação ao ano anterior. Comparando-se a produção atual com o montante produzido em 2008 (365.366 t), fica evidente o crescimento do setor no país, com um incremento de 31,2% na produção durante o triênio 2008-2010 (MPA,2010).

O crescimento da atividade no país é sustentado pela grande disponibilidade de recursos naturais e condições climáticas favoráveis. Recursos estes que mesmo com o crescimento dos últimos anos seguem sendo sub-explorados e dão margem a maiores produções nos próximos anos a fim de suprir a crescente demanda nacional e mundial destes produtos.

A maior parcela da produção aquícola brasileira provém da aquicultura continental, que atingiu no ano de 2010, 394.340 t produzidas. De acordo com estes dados, apenas a piscicultura continental representou 82,3% de toda produção nacional. Sendo a região sul a maior produtora de pescado do país, com 133.425 toneladas produzidas, ou seja, 33,8% da produção nacional. Somente o estado do Rio Grande do

Sul produziu aproximadamente 55.066 toneladas de pescado e continua sendo o maior produtor de pescado do Brasil. (MPA,2010).

A tilápia e a carpa foram as espécies mais cultivadas no ano de 2010 e somadas representaram 63,4% da produção aquícola nacional. Porém, o Brasil possui muitas espécies de peixes nativos com grande potencial para a aquicultura, distribuídos por todas regiões do país. Merecem destaque a produção de tambaqui, tambacu e pacu, que juntas representaram 24,6% da produção aquícola continental brasileira neste mesmo ano (MPA, 2010).

A produção de peixes na região sul do país está baseada no cultivo das diferentes espécies de carpas e tilápias, as quais são espécies exóticas, mas que são muito produzidas em todo o mundo. No entanto, pesquisadores juntamente com o setor produtivo, vêm demonstrando grande interesse no potencial que as espécies nativas possuem em produções comerciais. O sucesso destas espécies em cultivos comerciais apresenta muitas dificuldades devido a falta de conhecimentos sobre as condições específicas de cultivo.

Os pacotes tecnológicos já desenvolvidos para as principais espécies comerciais muitas vezes não são adequados às novas espécies de interesse econômico, causando resultados abaixo do esperado e frustração aos produtores. Dessa forma é de grande importância o incremento de pesquisas sobre estas espécies, a fim de elucidar alguns pontos críticos durante a produção e repassar estas informações aos produtores. Além disso, são necessárias pesquisas sobre a biologia e condições de cultivo adequadas para que as espécies nativas possam comprovar sua importância para a aquicultura. O conhecimento das técnicas de cultivo é imprescindível para que a produção das espécies

nativas de interesse comercial seja economicamente viável e competitiva com as outras espécies com protocolo de cultivo já estabelecido.

Para que a piscicultura possa desenvolver-se, é necessário o conhecimento sobre quais espécies que possuem características adequadas para cultivos comerciais, tornando a atividade viável. De um modo geral, os bagres Siluriformes brasileiros apresentam grande potencial para o cultivo, pois possuem boa qualidade de carne, ausência de espinhas intramusculares e rendimento de carcaça satisfatório (Campos, 1998).

Na região Sul do Brasil, o Jundiá *Rhamdia quelen*, aparece como uma alternativa às espécies exóticas, podendo ser cultivado individualmente ou em policultivo com outras espécies. Segundo dados do Boletim Estatístico do MPA (2010), somente em 2010 foram produzidas 1.274,3 toneladas da espécie.

O Jundiá está perfeitamente adaptado às condições ambientais das regiões mais frias do país, possui ótima aceitação à utilização de alimentos exógenos artificiais, apresenta bons índices produtivos e fácil manejo à reprodução artificial em cativeiro, características importantes para que uma espécie obtenha sucesso em cultivos comerciais.

1.2 Jundiá - *Rhamdia quelen*

Jundiá é o nome popular dado às diversas espécies de peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia*, amplamente distribuídas desde o México até a Argentina. O Jundiá, *Rhamdia quelen*, é um Siluriforme com variações de coloração de preto, marrom, amarelo à cinza. Porém, as variações na coloração dos animais estão mais ligadas ao habitat onde se encontram que as características genéticas. A exceção é a ocorrência do Jundiá “albino” ou “branco”. Comercialmente o Jundiá cinza, que é produto de

melhoramento genético, é mais produzido por apresentar melhores índices zootécnicos. (Gomes et al., 2000; Baldisseroto & Radünz Neto, 2004)

O Jundiá habita lagos e poços profundos dos rios, possui hábito bento-pelágico, sendo encontrado em ambientes lênticos com fundo arenoso ou lodoso. Prefere locais protegidos durante o dia e fica mais ativo à noite quando sai em busca de alimentos (Gomes et al., 2000). Em experimentos com larvas e alevinos de jundiá em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca de locais escuros (Piaia et al., 1999).

As larvas de jundiá são zooplantônicas, já adultos apresentam hábito alimentar omnívoro, com preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (Baldisseroto & Radünz Neto, 2004). O jundiá aceita muito bem a utilização de alimentos artificiais (Uliana, 1997; Piaia & Radunz Neto, 1997a, b), aproveitando muito bem fontes protéicas de origem animal e vegetal (Coldebella & Radunz Neto, 2002).

O jundiá pode suportar invernos rigorosos, onde com a diminuição de suas taxas metabólicas, encontra meios para suprir suas demandas energéticas de manutenção voltando ao seu crescimento normal nas estações de clima mais ameno. É considerado euritérmico, suportando grandes variações de temperatura. Suporta bem temperaturas entre 3°C e 32° C, porém seu melhor desempenho ocorre em 24 °C (Garcia et al., 2008). É uma espécie de rápido crescimento, mesmo em baixas temperaturas, podendo atingir peso comercial de até 1Kg em 1 ano de engorda (Barcellos et al., 2004). Adaptado a diferentes ambientes, o Jundiá apresenta bons resultados em viveiros de piscicultura. Sua carne é muito apreciada por consumidores da Argentina, Brasil e Uruguai (Salhi et al., 2004), além de possuir excelentes características para fins de processamento (Carneiro, 2003).

Sua boa aceitação a utilização de diferentes tipos de alimentos, sua rusticidade e adaptação aos diferentes ambientes de cultivos e suas variações climáticas, crescimento rápido, o domínio das técnicas de reprodução em cativeiros, além de sua boa aceitação no mercado consumidor, fazem desta espécie uma das mais promissoras da piscicultura de água doce brasileira (Gomes et al., 2000; Coldebella & Radünz Neto, 2002; Barcellos et al., 2004).

1.3. Amônia

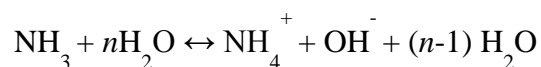
Em cultivos intensivos ou semi-intensivos, o alimento natural dos viveiros torna-se insuficiente para manutenção e crescimento rápido dos animais. Sendo assim, são utilizados alimentos que normalmente apresentam altos percentuais de proteína, as quais, em parte, são absorvidas e utilizadas pelos animais e outra parte acaba sendo excretada pelos mesmos. O nitrogênio, produto do metabolismo das proteínas, pode ser excretado nas fezes na forma de nitrogênio orgânico ou como amônia, que é a principal forma de excreção dos animais aquáticos. Outras fontes que podem elevar as concentrações de nitrogênio na água são as sobras de alimentos em decomposição e fertilizações orgânicas e inorgânicas nitrogenados.

Níveis elevados de nitrogenados, principalmente amônia, atuam como um fator limitante para crescimento e sobrevivência dos peixes (Person-Le Ruyet et al., 1995; 1998), sendo que em sistemas fechados ou de recirculação podem ser atingidos os níveis de amônia elevados em função das altas densidades de estocagem e oferta de alimentos. Por isso, a manutenção das concentrações dos nitrogenados em níveis seguros de sobrevivência e que permita o bom desempenho dos animais é fundamental para o sucesso de um cultivo. Estes níveis de segurança, que garantem bom crescimento e desempenho dos animais são específicos e espécie-específicos.

Dentre as formas nitrogenadas encontradas na água, a amônia causa os maiores danos aos animais, pois é tóxica em baixas concentrações. (Arana, 1997). Por isso, em sistemas fechados é importante a existência de filtros biológicos, com bactérias nitrificantes (Baldisseroto, 2002). Sistemas onde a renovação de água é intensa os nitrogenados não alcançam níveis de risco aos animais, porém estes sistemas demandam uma quantidade imensamente superior deste recurso.

A amônia tem recebido atenção especial como um dos fatores limitantes na criação intensiva de peixes (Tomasso, 1994; Miron et al., 2008). Esse resíduo nitrogenado pode atingir rapidamente concentrações tóxicas em sistemas intensivos mal manejados, causando redução da sobrevivência, do crescimento e até mesmo a morte dos animais (Urbinati & Carneiro, 2004).

A amônia é encontrada na água na forma ionizada, ou íon amônio (NH_4^+) ou na forma não-ionizada (NH_3), sendo a amônia total a soma das duas formas. Em soluções aquosas as duas formas de amônia estão representadas pela seguinte equação de equilíbrio (Emerson et al., 1975):



A proporção entre as duas formas de amônia é determinada basicamente pela temperatura e pH da água, e em menor importância pela salinidade. A concentração relativa de NH_3 aumenta com o aumento da temperatura e do pH e diminui com o aumento da salinidade (Bower & Bidwell, 1978).

A amônia não ionizada é a forma mais tóxica aos animais, pois sua molécula difunde-se facilmente nas células dos peixes (Hillaby & Randall, 1979). A amônia não

ionizada possui uma natureza lipofílica difundindo-se facilmente através das membranas biológicas, diferentemente da amônia ionizada que por ocorrer em moléculas maiores, hidratadas e carregadas, não conseguem atravessar estas membranas com tamanha facilidade (Randall & Tsui, 2002). Quando os níveis de amônia não ionizada estão elevados na água, há um aumento por difusão na entrada destas moléculas nos animais, por estes apresentarem níveis internos inferiores. Quando os níveis elevam-se no organismo dos animais, restabelece-se o equilíbrio interno das duas formas de amônia, onde a amônia não ionizada que foi captada por difusão é convertida em amônia ionizada, aumentando os níveis desta outra forma e permitindo que mais amônia não ionizada seja carregada para o interior das células (Randall & Tsui, 2002).

Por isso, o aumento na concentração externa de amônia não ionizada mesmo que pequeno, pode aumentar de forma significativa a concentração de amônia total interna dos animais, assim, qualquer pequeno aumento na concentração externa de NH_3 pode causar um grande aumento na concentração interna de amônia total, excedendo as concentrações toleradas pelo organismo (Das et al., 2004).

Para juvenis de jundiá a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ fica na faixa de 1,2 (Ferreira et al., 2013) a 1,45 (Miron et al., 2008) $\text{mg NH}_3/\text{L}$, já para salmonídeos esta faixa é de 0,41 a 3,1 $\text{mg NH}_3/\text{L}$ (RUFFIER et al., 1981). Entretanto aumentando-se a dureza da água de 40 para 400 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ e 5 para 80 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ os níveis da $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ de NH_3 para o bagre de canal e o sunshine bass, respectivamente, também aumentam (Tomasso et al., 1980; Wheirich et al., 1993).

Os peixes possuem diferentes mecanismos fisiológicos de eliminação da amônia, para que os níveis internos não se tornem tóxicos. A maior parte da amônia é eliminada através das brânquias, o rim também colabora com a excreção, porém com menos de 2% da excreção total (Hillaby & Randall, 1979; Randall & Wright, 1987). Quando os níveis de amônia externos estão baixos, amônia não ionizada (NH_3) pode ser eliminada através de difusão passiva a favor de um gradiente químico. Já a forma ionizada (NH_4^+) pode ser eliminada por difusão passiva a favor de um gradiente eletro químico e também através de um trocador $\text{Na}^+ / \text{NH}_4^+$ que localiza-se na membrana apical das brânquias. Porém, em teleósteos de água doce a excreção de amônia é principalmente através da difusão passiva de NH_3 , sendo os outros mecanismos menos relevantes (Wilson, 1996).

A sensibilidade de muitas espécies de teleósteos dulcícolas a altas concentrações de amônia pode culminar na morte dos animais (Moraes et al., 2004). Os sintomas de intoxicação aguda pela amônia incluem hiperventilação, hiperexcitabilidade, convulsões, perda de equilíbrio, coma e morte (Twitchen & Eddy, 1994). Esta toxicidade aguda decorre principalmente de seu efeito no sistema nervoso central, mas o mecanismo de ação da amônia ainda é controverso tanto para mamíferos como para teleósteos (Person-Le Ruyet et al., 1998). Segundo Randall & Tsui (2002), a causa primária da toxidade da amônia para peixes pode decorrer do efeito despolarizante do íon NH_4^+ nos neurônios, que atua em substituição ao K^+ .

Como descrito anteriormente, altas concentrações de amônia podem levar à morte dos animais, porém essas concentrações são dificilmente atingidas em viveiros de produção. O problema ocorre quando os animais estão sujeitos a concentrações

subletais, as quais desencadeiam alterações bioquímicas, fisiológicas, histológicas e comportamentais que levam a diminuição do crescimento e prejudicam o sistema imunológico dos animais (Hargreaves & Kucuk, 2001; Miron et al., 2008).

Os efeitos das concentrações subletais de amônia podem ser observados através de parâmetros fisiológicos nos animais, como: hematócrito, concentrações iônicas no plasma, níveis de glicose e cortisol, alterações morfológicas das brânquias, lipoperoxidação e a atividade de enzimas pertencentes ao sistema antioxidante, responsável pelos processos de detoxificação.

1.4. Dureza

A dureza da água, que tem como unidade mg CaCO₃/L, é determinada pelo conteúdo de sais de Ca⁺ e Mg⁺, os quais podem ser abundantes na água doce, e estão ligados aos íons carbonato (CO₃⁻²) e bicarbonato (HCO₃⁻) ou a sulfato (SO₄⁻²), cloreto (Cl⁻) e outros ânions de acidez mineral (Arana, 2004).

Os peixes dependem do Ca²⁺ para formação do esqueleto, coagulação sanguínea, funções musculares e transmissão de impulsos nervosos, bem como demais funções celulares (Lovell, 1989; Coote et al., 1996, Parra & Baldisserotto, 2007). O Ca²⁺ exerce um papel fundamental na regulação iônica porque influi na permeabilidade das membranas biológicas, evitando o fluxo difusivo e as altas perdas iônicas para a água (Gonzal et al., 1987; Wood & McDonald, 1988; Parra & Baldisserotto, 2007). A manutenção dos níveis plasmáticos de Ca²⁺ dependem basicamente da ingestão deste íon presente nos alimentos ou através da captação branquial do cálcio disponível no meio de cultivo, pois as fontes internas são pouco acessíveis (Flik et al., 1995).

Hwang et al. (1996) demonstraram que a principal via de absorção do Ca^{2+} é através das brânquias, porém os animais aquáticos também captam cálcio a partir da água e dos alimentos no intestino (Flik et al., 1993; Flik & Verbost, 1995). No entanto, em condições normais peixes de água doce ingerem pouca água, sendo o cálcio absorvido pelo intestino proveniente dos alimentos (Flik et al., 1996). A relação de cálcio captado da água ou do alimento, absorvidos das brânquias ou do intestino, depende diretamente da disponibilidade deste tanto na água quanto nos alimentos. Em águas de baixa dureza, o cálcio provém principalmente dos alimentos, já quando os alimentos são pobres em cálcio os animais aumentam sua captação diretamente da água através das brânquias.

A absorção de minerais diretamente da água pelos teleósteos varia de acordo com cada espécie e também com as concentrações dos minerais, temperatura e pH da água (Steffens, 1997). Os peixes possuem bombas de Ca^{2+} - ATPase localizadas nas brânquias e membrana opercular e um cotransportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nas células de cloreto, que transfere o Ca^{2+} das células para o plasma. Assim, há uma diminuição da concentração de Ca^{2+} dentro das células, permitindo que mais Ca^{2+} do meio externo entre nas células através de um canal Ca^{2+} . Em águas de baixa dureza, aumenta a quantidade das células de cloreto, a fim de compensar a absorção dos íons (Flik et al., 1995). O pH também pode influenciar na captação de íons Ca^{2+} , pois íons H^+ em excesso competem com o Ca^{2+} , dificultando sua absorção (Ferreira et al., 2013).

O aumento dos níveis de dureza, ou seja, as concentrações dos níveis de Ca^{2+} e Mg^{2+} , aumenta a resistência dos peixes à diversas substâncias tóxicas, assim como a amônia. Segundo Baldisserotto (2002), provavelmente esta maior resistência provém da diminuição da permeabilidade branquial. Além disso, através do aumento da atividade

da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, o Ca^{2+} induz a um aumento do influxo de Na^+ , aumentando assim a resistência do peixe à amônia (Walsh et al., 2007).

Os efeitos da dureza da água sobre o crescimento variam de acordo com a espécie de peixe e a qualidade da água. Espécies que são encontradas em ambientes naturais de água dura requerem a mesma qualidade para um bom desenvolvimento, enquanto que para aquelas encontradas naturalmente em águas moles, águas duras podem ocasionar efeitos deletérios prejudicando seu crescimento e sobrevivência (Parra & Baldisserotto, 2007). Copatti et al. (2008) demonstraram que as melhores concentrações de dureza para o crescimento e ionorregulação de juvenis de jundiá são de 30-60 mg CaCO_3/L .

Juvenis de jundiá quando submetidos a altos níveis de amônia na água (0,623 mg NH_3/L) podem ser beneficiados pela utilização de maiores níveis de dureza da água de cultivo, pois estes maiores valores de dureza melhoram a sobrevivência e o crescimento dos animais (Ferreira et al., 2013).

1.5. Estresse Oxidativo

Durante a criação em cativeiro os peixes enfrentam variações da qualidade da água (pH, amônia, nitrito, nitrato, oxigênio dissolvido, temperatura). Isto ocorre devido à excessiva quantidade de alimento fornecido, grande carga de biomassa de peixes nos tanques, quantidade de amônia excretada, processo de fotossíntese, clima, entre outros fatores.

Estes fatores estressantes ocasionam muitas mudanças fisiológicas, as quais estão envolvidas nas respostas ao estresse, incluindo a hematologia (Dethloff et al., 1999), osmolaridade e/ou balanço dos eletrólitos (McDonald & Milligan, 1997),

liberação de hormônios, metabolismo energético e na atividade dos antioxidantes (Carragher & Rees, 1994; Barton & Iwama, 1991). A atividade antioxidante da catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e glutathiona-S-transferase tendem a minimizar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo (Belló et al., 2000), pois estes antioxidantes atuam eliminando as espécies ativas de oxigênio formadas a partir da redução do oxigênio a nível tecidual.

Entretanto, sob condições normais, existe um equilíbrio entre a produção de pró-oxidantes e as defesas antioxidantes. O desequilíbrio a favor dos pró-oxidantes caracteriza a condição de estresse oxidativo, sendo que esta situação pode induzir danos em nível de DNA e RNA, induzindo mutações, o que é muito importante na carcinogênese e nos efeitos da radiação ionizante; o ataque às proteínas e enzimas, causando a oxidação de grupamentos tióis (-SH) metionila e carbonila; a peroxidação lipídica, podendo causar alterações na permeabilidade da membrana e perda da função secretória até a morte celular (Halliwell, 1992). Este dano tecidual, o trauma e as toxinas geralmente desencadeiam uma série de eventos em nível intracelular que conduzem a uma situação de estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Semelhante aos mamíferos, os peixes possuem mecanismo de defesa para neutralizar a ação das EAO (Ahmad et al., 2000). Este sistema é formado pelos anti-oxidantes enzimáticos catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona transferase (GST); e pelos anti-oxidantes não enzimáticos glutathiona (GSH), α -tocoferol (vit. E), caroteno, entre outros.

As enzimas antioxidantes SOD e CAT, foram observadas no fígado, sangue e plasma de tamoquis no seu habitat natural, e são efetivas para prevenir ou atenuar o

estresse oxidativo, sendo que estas defesas estão situadas em diferentes tecidos e em diferentes compartimentos sub-celulares e atuam em conjunto (Marcon & Wilhelm Filho, 1999). Estas defesas também são ativadas em respostas a exposição a poluentes em várias espécies de peixes, como em carpas (*Cyprinus carpio*), catfish (*Ictalurus nebulosus*) (Ahmad et al., 2000) e truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) (Dorval et al., 2003), jundiá (Ferreira et al., 2010; Menezes et al., 2011a; Menezes et al., 2011b) expostos a pesticidas. Além disso, juvenis de jundiá também apresentam alterações nos níveis de CAT, GST e TBARS quando expostos ao tório (Correa et al., 2008), cádmium (Preto et al., 2011), infectados com *Ichthyophthirius multifiliis* (Garcia et al., 2011) e durante o transporte (Azambuja et al., 2011). Porém poucos estudos foram desenvolvidos para verificar se a degradação da qualidade da água do ambiente de cultivo afeta os peixes, provocando assim um estresse nestes animais, prejudicando a produtividade e os lucros ao criador.

Diante destes fatores é fundamental estudarmos os efeitos ocasionados nos tecidos (estresse oxidativo) pelos diferentes níveis de dureza e amônia na água, em juvenis de jundiá, para termos maiores informações acerca dos danos gerados a esta espécie pela exposição a estes dois fatores. Esta abordagem deverá proporcionar dados importantes para o desenvolvimento do jundiá, beneficiando uma grande gama de piscicultores.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo verificar os efeitos da exposição de juvenis de jundiá a diferentes níveis de dureza e amônia na água e suas influências nos parâmetros de estresse oxidativo.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as alterações na atividade de lipoperoxidação celular (TBARS) no fígado, e brânquias ocasionados pelos diferentes níveis de dureza e amônia na água;
- Avaliar os efeitos ocasionados nas enzimas antioxidantes catalase (CAT), e glutathione transferase (GST) no fígado e brânquias ocasionados pelos diferentes níveis de dureza e amônia na água.

3. Referências Bibliográficas

- Ahmad, I.; Hamid, T.; Fatima, M.; Chand, H.S.; Jain, S.K.; Athar, M.; Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523, 37-48.
- Arana, L.V., 1997. Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aqüicultura: Uma Revisão para Peixes e Camarões. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- Arana, L.V., 2004. Princípios químicos de qualidade da água em aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis, EDUFSC, 231.
- Azambuja, C.R.; Mattiazzi, J.; Riffel, A.P.K.; Finamor, I.A. ; Garcia, L.O.; Heldwein, C.G.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto, B.; Pavanato, M.A.; Llesuy, S.F., 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture*, 319, 156-161.
- Baldisserotto, B., 2002. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- Baldisserotto & Radünz Neto, 2004. Criação de jundiá. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- Barcellos, L.J.G.; Kreutz, L.C.; Quevedo, R.M.; Fiorezi, I.; Cericato, L.; Soso, A.B.; Fagundes, M.; Conrad, J.; Baldissera, R.K.; Bruschi, A.; Ritter, F., 2004. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture* 232, 383-394.

- Barton, B.A.; Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 10, 3-26.
- Belló, A.R.R; Fortes, E., Belló-Klein,A.; Belló, A.A.; Llesuy, S.F.; Robaldo, R.B.; Bianchini, A., 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42, 233-236.
- Boyd, C.E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, AL, USA.
- Bower, C.E., and J.P. Bidwell., 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 25, 1012-1016.
- Campos, J.L., 1998. Produção intensiva de peixes de couro no Brasil. In: II Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes. Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. p. 61-72. 198 p.
- Carneiro, P.C.F.; Mikos, J.D.; Benhack, F., 2003. Processamento: o jundiá como matéria-prima. *Panorama da Aqüicultura* 13, 17-21.
- Carragher, J.F.; Rees, C.M., 1994. Primary and secondary stress responses in golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107A, 49-56.

- Chippari Gomes, A.R.; Gomes, L.C.; Baldisserotto, B., 1999. Lethal temperature for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture* 9, 11-21.
- Chippari-Gomes, A.R., 1998. Temperaturas letais de larvas e alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 70.
- Coldebella, I.; Radunz Neto, J. , 2002. Farelo de Soja na alimentação de alevinos de jundiá. *Ciência Rural* 32, 499 – 503.
- Coote, T.A.; Hone P.W.; Kenyon R.; Maguire G.B., 1996. The effect of different combinations of dietary calcium and phosphorus on the growth of juvenile *Haliotis laevigata*. *Aquaculture* 145, 267-279.
- Copatti, C.E., Garcia, L.O., Kochhann, D., Cunha, M.A., Baldisserotto, B., 2011. Dietary salt and water pH effects on growth and Na + fluxes of silver catfish juveniles. *Acta Scientiarum-Animal Sciences* 33(3), 261–266.
- Correa, L.M.; Kochhann, D.; Becker, A.G.; Pavanato, M.A.; Llesuy, S.F.; Loro, V.L.; Raabe, A.; Mesko, M.F.; Flores, E.M.M.; Dressler, V.L.; Baldisserotto, B., 2008. Biochemistry, cytogenetics and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. *Aquatic toxicology* 88 (4), 250-256.
- 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). *Aquaculture Research* 35, 134-143.

- Dethloff, G.M., Schlenk, D.; Khan, S.; Bailey, H.C., 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 36, 415-423.
- Dorval, J.; Leblond, V.S.; Hontela, A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. Aquatic Toxicology 63, 229-241.
- Emerson, K.; Russo, R.C.; Lund, R.E.; Thurston. R.V., 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. Journal of Fisheries Research Board of Canada 32, 2379-2383.
- Ferreira, D.; Da Motta, A.C.; Kreutz, L.C.; Toni, C.; Loro, V.L.; Barcellos, L.J.G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. Chemosphere 79, 914–21.
- Ferreira, F.W.; Cunha, R.B.; Baldisserotto, B., 2013. The survival and growth of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*, exposed to diferente NH₃ and hardness levels. Journal of the World Aquaculture Society, 44 (2), 293-299.
- Flik, G.; Verbost, P.M., 1995. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In: Hochachka, P.W.; Mommsen, T.P. (Eds), Molecular Biology Frontiers. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, Amsterdam. 5, 251-263.
- Flik, G.; Van Der Velden, J.A; Dechering, K.J.; Verbost, J.M.; Schoenmakers, J.M.T.H.

- Kolar, Z.I.; Wendelaar Bonga, S.E., 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. *Journal of Experimental Zoology* 265, 356-366.
- Flik, G., Klaren, P.H.M.; Schoenmakers, T.J.M.; Bijvelds, M.J.C.; Verbost, P.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1996. Cellular calcium transport in fish: unique and universal mechanisms. *Physiological Zoology* 69 (2), 403 – 417.
- Garcia, L.O.; Becker, A.G.; Bertuzzi, T.; Cunha, M.A.; Kochhann, D.; Finamor, I.A.; Riffel, A.P.K.; Llesuy, S.F.; Pavanato, M.A.; Baldisserotto, B., 2011. Oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles infected with *Ichthyophthirius multifiliis* and maintained at different levels of water pH. *Veterinary parasitology* 178 (1-2), 15-21.
- Gomes L.C.; Golombieski, J.I.; Chippari Gomes, A.R.; Baldisserotto, B., 2000. *Biologia do Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30, 179-185.
- Gonzal, A.C.; Aralar, E.V.; Pavico, J.M., 1987. The effects of water hardness on the hatching and viability of silver carpas (*Hypophthalmichthys molitrix*) eggs. *Aquaculture*. 64, 111-118.
- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59, 1609-1623.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., 1999. *En free radicals in biology and medicine*. 3 ed. Oxford University Press.
- Hargreaves, J.A.; Kucuk, S., 2001. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuations on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. *Aquaculture* 195, 163-181.

- Hillaby, B.A.; Randall, D.J., 1979. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Fisheries Research Board of Canada 36, 621-629.
- Hwang, P. P.; Tung, Y. C; Chang, M. H., 1996. Effect of environmental calcium levels on calcium uptake in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). Fish Physiology and Biochemistry 15, 363-370.
- Lovell, R.T., 1989. Nutrition and Feeding of Fish. Van Nostrand-Reinhold, New York. 260.
- Marcon, J.L.; Wihelm Filho, D., 1999. Antioxidants process of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. Comparative and Biochemistry and Physiology Part C. 123, 257-263.
- McDonald, D.G.; Milligan, C.L., 1997. Ionic, osmotic and acidbase regulation in stress. In: Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press, UK, 119–144.
- Menezes, C.C.; Loro, V.L.; Da Fonseca, M.B.; Cattaneo, R.; Pretto, A.; Miron, D.S.; Santi, A., 2011a. Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. Pesticide Biochemistry and Physiology 100(2), 145–150.
- Menezes, C.C.; Fonseca, M.B.; Loro, V.L.; Santi, A.; Cattaneo, R.; Clasen, B.; Pretto, A.; Morsh, V.M., 2011b. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 60(4), 665–71.

- Miron, D.S.; Silva, L.V.F.; Golombieski, J.I; Baldisserotto, B., 2003. Efficacy of different salt (NaCl) concentration in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* – infected silver catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture* 14 (1/2), 155-161.
- Miron, D.S.; Moraes, B.; Becker, A.G.; Crestani, M.; Spanevello, R.; Loro, L.V.; Baldisserotto, B., 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture* 277, 192–196.
- Moraes, F.R.; Martins M.L., 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática (AQUABIO), Jaboticabal, SP, 343-383.*
- Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA).*
- Parra, J.E.G.; Baldisserotto, B., 2007. Effect of water pH and hardness on survival and growth of freshwater teleosts. In: *Fish osmoregulation. Science Publishers: New Hampshire, USA, 135-150.*
- Person-Le Ruyet, J.; Chartois, H.; Quemener, L., 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture* 136, 181-194.
- Person-Le Ruyet, J.; Boeuf, G.; Zambonino Infante, J.; Helgason, S.; Le Roux, A., 1998. Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119A(2), 511-518.

- Piaia, R.; Radünz Neto, J., 1997a. Avaliação de diferentes fontes protéicas sobre o desempenho inicial de larvas do jundiá *Rhamdia quelen*. *Ciência Rural*, Santa Maria 27(2), 319-323.
- Piaia, R.; Radunz Neto, J., 1997b. Efeito de níveis crescentes de levedura de álcool em rações contendo fígado bovino sobre a performance de larvas de jundiá *Rhamdia quelen*. *Ciência Rural*, Santa Maria 27(2), 313-317.
- Piaia, R.; Townsend, C.R.; Baldisserotto, B., 1999. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. *Aquaculture International* 7, 201-205.
- Preto, A.; Loro, V.L.; Baldisserotto, B.; Pavanato, M.A.; Moraes, B.S.; Menezes, C.; Cattaneo, R.; Clasen, B.; Finamor, I.A.; Dressler, V., 2011. Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60(2), 309–18.
- Randall, D.J.; Wright P.A., 1987. Ammonia distribution and secretion in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 3(3), 107-120.
- Randall, D.J.; Tsui T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 17-23.
- Ruffier P.J.; Boyle W.C.; Kleinschmidt, J., 1981. Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 53, 367-377.

- Salhi, M.; Bessonart, M.; Chediak, G.; Bellagamba, M.; Carnevia, D., 2004. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture* 231, 435-444.
- Steffens, W., 1997. *Princípios fundamentais de la alimentación de los peces*. Zaragoza, 272.
- Tomasso, J.R.; Davis, K.B.; Parker, N.C., 1980. Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics of hybrid striped bass (white bass x striped bass) during netting and hauling. *Proc. World Maric. Soc.* 11, 303–310.
- Tomasso, J.R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science* 2, 291-314.
- Twitchen, I.D.; Eddy, F.B., 1994. Sublethal effects of ammonia on freshwater fish. *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Blackwell Scientific Publications, Fishing News Books, Londres, UK, 135-147.
- Urbinati, E.C.; Carneiro P.C.F., 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática (Aquabio). Jaboticabal, SP, 171-193
- Uliana, O., 1997. Influência de diferentes fontes e níveis de lipídeos sobre a criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), Pisces, Pimelodidae. Santa Maria – RS, 1997. 57 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pósgraduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

- Walsh, P.J.; Veauvy, C.M.; McDonald, M.D.; Pamentier, M.E.; Buck, L.T.; Wilkie, M.P., 2007. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147, 332-343.
- Weirich, C.R.; Tomasso, J.R., 1993. Toxicity of ammonia and nitrite to sunshine bass in selected environments. *Journal Aquatic Animal Health* 5, 64-72.
- Wood, C.M.; McDonald, G., 1988. Impact of environmental acidification on gill function in fish. Environmental Protection Agency. International Symposium Guangzhou, 162-182.
- Wilson, R., 1996. Ammonia excretion in fish adapted to an ion-poor environment. *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. INPA, Manaus, 123-138.
- Zaniboni Filho, E., 2002. Valorização das espécies nativas. Esforços para o desenvolvimento de pacote tecnológico. In: XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA. Associação Brasileira de Aquicultura.

Interaction of water hardness and ammonia levels in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles and their influence on oxidative stress parameters

Prati, R.L.^{1,3}, Toni, C.², Salbego, J.², Finamor, I.A.², Pavanato M.A.², Baldisserotto, B.²,
Garcia, L.O.^{1,3*}

¹Instituto de Oceanografia, Estação Marinha de Aquicultura, Laboratório de Qualidade da Água, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil.

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

*Corresponding author: Estação Marinha de Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 96210-030, Rio Grande, RS, Brazil. Phone: 55 53 3236-1685; E-mail address: garcia_log@hotmail.com.br (Garcia, L.O.)

Abstract

In the present study we evaluated the effects of different levels of hardness and un-ionized ammonia in water on oxidative stress parameters in silver catfish juveniles *Rhamdia quelen*. After an initial period of acclimatization to different levels of water hardness (25 and 120 mg CaCO₃ L⁻¹), juveniles were exposed to experimental concentrations of ammonia (0.02; 0.18 and 0.50 mg NH₃ L⁻¹) for five days. Were collected prior to ammonia exposure (control), the first and fifth days after exposure. The animals were previously anesthetized and samples were collected from liver and gills for analysis of antioxidant enzymes Glutathione-S-transferase (GST) and Catalase, and the determination of lipid peroxidation (TBARS) in these tissues. There was no influence of the hardness levels on mortality, where treatments that had the same levels of ammonia and different levels of water hardness did not differ between them. Treatments with 0.50 mg NH₃ L⁻¹, in both hardness levels, reached 100% mortality after 24 hours of exposure. The TBARS levels in liver were significantly higher (89.8 %) in treatment with 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ than in treatment 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ on the 5th day of exposure. In gills, the treatment 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ showed an increase of 132.6% TBARS levels in the fifth day when compared to the control. Already treatments 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 e 0.18 mg NH₃ L⁻¹ showed a decrease of 145.1 and 122.7%, respectively, TBARS levels compared to control. On the fifth day of exposure, treatment with 25 mg CaCO₃ L⁻¹, in both ammonia levels, showed higher levels of TBARS compared to treatments with 120 mg CaCO₃ L⁻¹ in both ammonia levels. The catalase enzyme in liver, showed an increase (172.9%) and a decrease (65.5%) of its activity, the fifth day, at the treatments 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 and 0.18 mg NH₃ L⁻¹, respectively when compared to control. In gills,

catalase enzyme showed greater activity in the treatment 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ when compared to all other treatments (73.1, 104.5 and 150.3%). On the fifth day, the GST enzyme showed a decrease in activity of approximately 45%, in the liver of animals exposed to 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ when compared to the other treatments. The results show that high levels of hardness are not able to prevent mortality in animals exposed the extreme concentrations of un-ionized ammonia, however assists in maintaining the oxidative status of animals exposed to intermediate concentrations of un-ionized ammonia.

1. Introduction

In fish culture ponds a good water quality is dependent of various chemical factors dissolved in the water (dissolved oxygen, pH, total and unionized ammonia, hardness, and alkalinity), as well as temperature and others physical attributes, all combined to enhance the development of organism and consequently better productivity (Person-Le Ruyet et al., 1997; Diana et al., 1997).

The silver catfish (*Rhamdia quelen*), an indigenous species of South American rivers is found from southern Mexico to central Argentina, being more intensively cultured in Brazil, Uruguay and Argentina. Silver catfish presents good growth rate, omnivorous feeding habit, high fertilization and hatching rates, great acceptance by consumers and good market price (Gomes et al., 2000).

Water quality conditions in the fish culture are essential for best organism developmental. Presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, in water, are important for several physiological processes, being calcium important due to their influences in the

permeability of biological membranes (Wood & McDonald, 1988), in addition, is also essential in bone construction, blood coagulation, and other cellular functions (Flik et al. 1995). Increase of water hardness can provide benefits as improved survival and growth in acidic and alkaline water (Townsend & Baldisserotto, 2001; Copatti et al., 2011), and reduces the NH_3 toxicity in freshwater in short-term for channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Tomasso et al., 1980) and “sunshine bass” (females *Morone chrysops* × males *Morone saxatilis*) (Weirich et al., 1993). This effect is also observed for some species where water hardness is needed for good development, mitigating the deleterious effect of non-optimal water quality conditions (Baldisserotto, 2011).

Silver catfish production is affected by increases in ammonia concentration in the culture ponds to which impairs weight gain, growth rate, biomass and survival (Becker et al., 2011; Copatti et al., 2011a, b; Ferreira et al., 2013).

In aquatic environments, ammonia exists as un-ionized ammonia (NH_3) and ionized ammonium (NH_4^+) (Wajsbrodt et al., 1993; Randall and Tsui, 2002). The toxicity of ammonia is attributed to its un-ionized form (NH_3) (Russo and Thurston, 2001; Miron et al., 2008), which can readily diffuse across gill membranes due to its lipid solubility and lack of charge. This product of proteins metabolism is mainly excreted through the gills (Wicks and Randall, 2002; Wilkie, 2002) usually after feeding (Altinok and Grizzle, 2004). The increase of environmental ammonia occurs especially in production system with little or no water exchange. As a result, blood and tissue ammonia levels increase and fish experience both chronic and acute toxic effects (Randall and Tsui, 2002; Dosdat et al., 2003; McKenzie et al., 2003; Lemarie et al., 2004) during the culture.

Furthermore, ammonia is toxic for many reasons (Cooper and Plum, 1987), one of which is that ammonia can lead to oxidative stress (Kosenko et al., 1997), due to active respiratory and osmoregulatory processes in the gills, because they show a high capacity to produce ROS (Ip et al., 2001). However, there is little information about the consequences caused in freshwater fish with relation to oxidative damage and lipid peroxidation during environmental ammonia exposure.

Oxidative stress is defined as an unbalanced state between pro-oxidants and antioxidants, resulting in elevated production of reactive oxygen species (ROS), agents with a potential for producing deleterious effects (Matés et al., 1999; Halliwell, 1992; Halliwell and Gutteridge, 1999). Oxidative stress can be induced by a large variety of conditions, including exposure to chemical and physical environmental agents (Chow, 1991). The unbalanced state of pro-oxidant and antioxidants can induce attack to proteins and enzymes causes oxidation of thiol groups (-SH) and in consequence the lipid peroxidation that could induce membrane permeability changes and loss of secretory function and even to cellular death. The tissue damage and released toxins usually unchain a series of events in intracellular level that lead to a situation of oxidative stress (Halliwell, 1992; Halliwell and Gutteridge, 1999), which can be detected through measurement of oxidative stress parameters in the fishes.

Therefore, the aim of this study is to analyze toxicity of un-ionized ammonia (NH₃) in the oxidative stress parameters in liver and gill of the silver catfish *Rhamdia quelen* juveniles submitted to different water hardness.

2. Materials and methods

2.1. Experimental Animals

Two hundred thirty four silver catfish juveniles (20.5 ± 0.3 cm and 76.3 ± 2.5 g) were obtained from fish farmers around Santa Maria city, southern Brazil. These juveniles were carried at the Fish Physiology Laboratory at the Universidade Federal de Santa Maria, where they were maintained, in acclimation, for ten days in eighteen continuously aerated (using two 20 W air pumps) 250-L tanks (thirteen juveniles/tank), ammonia free and water hardness in values of $25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. The second acclimation was performed for ten days in the previous same conditions, but with addition of CaCO_3 (25 or without addition and 120 mg L^{-1}). After this period NH_4Cl was added to the tanks for performed experimental conditions (ammonia levels). The treatments were combinations between water hardness and ammonia levels: $25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1} - 0.02 \pm 0.008 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (control - without the addition $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ and NH_4Cl); $25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1} - 0.18 \pm 0.02 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$; $25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1} - 0.50 \pm 0.007 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$; $120 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1} - 0.02 \pm 0.008 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$; $120 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1} - 0.18 \pm 0.02 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$; $120 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1} - 0.50 \pm 0.007 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Experiments were performed, in triplicate, for 5 day. The methodology of this experiment was approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Universidade Federal do Rio Grande - FURG (Process n° P005/2012).

2.2. Tissue collection

Fish were collected to the experiment start or 0, 1 and 5 days after exposure to the experimental conditions, $N = 9$, for treatment. These fish were placed in recipients with water and ice for 5 min for anesthetizing and after killed by spinal section, and the

tissues (liver and gills) were removed, weighed separately, and immediately frozen in liquid argon. The tissues were then stocked in a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer for subsequent analysis of TBARS and oxidative stress parameters.

2.3. Water Quality and Tank Management

In the experimental period the water pH (DMPH-2 pH meter), dissolved oxygen and temperature (oxygen meter model YSI 5512), total (Eaton et al., 2005) and un-ionized ammonia (Colt, 2002), water hardness levels (Greenberg et al., 1976), total alkalinity and nitrite (Boyd, 1998) were measured daily. Laboratory temperature was maintained by using an air conditioner during all experimental period. Ammonia and water hardness were changed to the experimental levels by adding NH_4Cl and CaCO_3 to the tanks where the fish were placed. In all treatments, juveniles were fed with 3 % of body biomass once a day during all experimental period.

2.4. Parameters of oxidative stress

The liver and gills tissues were homogenized in 1.15% (w/v) KCl solution containing 1mM Phenylmethylsulphonyl-Fluoride (PMSF). The homogenates were centrifuged at $600\times g$ for 10 min to eliminate nuclei and cell debris, and the supernatant fraction obtained was frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further measurements. The supernatants were used for analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT). The protein content of the homogenate was measured using the method described in Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as the standard. Lipid peroxidation was measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using the method described by Buege and Aust (1978). In this method, absorbance measurements at 535nm were used to measure the reaction

between thiobarbituric acid and the lipoperoxidation (LPO) products, resulting in the formation of a chromogen (Schiff's base). The results were reported as nmol mg protein⁻¹. Glutathione-S-transferase activity towards CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) was determined spectrophotometrically at 340 nm using the method described in Habig et al. (1974). Activity was calculated by changes in absorbance at 340 nm using the extinction coefficient of 9.6mmol⁻¹.cm⁻¹. One unit of GST activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the conjugation of 1µmol of CDNB with GSH per minute at 25 °C. The results were reported as pmol min⁻¹ mg protein⁻¹. CAT activity was determined by using the method described by Boveris and Chance (1973), in which the disappearance of H₂O₂ is followed spectrophotometrically at 240 nm. The results were reported as pmol mg protein⁻¹.

2.6. Statistical analysis

Data are reported as mean ± SEM (*N*= 9). Homogeneity of variances among groups was tested with Levene test. Data for TBARS, GST and CAT presented homogeneous variances, and comparisons between different treatments were made by two-way analysis of variance and Newmann-Keuls test. Analysis was performed using the software Statistica, and the minimum significance level was set at *P* < 0.05.

3. Results

The physicochemical water quality parameters and mortality during the experimental period are shown in Table 1. Water quality parameters remained at suitable concentrations for silver catfish, except for ammonia and water hardness, which were modified for experimental perform. Data control in day 0 did not show

significantly difference themselves and were united in one only data for 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 mg NH₃ L⁻¹ (0 day or control , without the addition CaCO₃ L⁻¹ and NH₄Cl).

Mortality was observed in silver catfish exposed to 0.5 mg NH₃ L⁻¹ after first day achieving values of 100 % before the end of experiment. Silver catfish exposed to 0.18 mg NH₃ L⁻¹ had a mortality of 63.9 ± 9.4 % at 25 mg CaCO₃ L⁻¹ and 57.6 ± 9.5 % at 120 mg CaCO₃ L⁻¹. The water hardness did not affect silver catfish survival.

Silver catfish juveniles exposed to 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 mg NH₃ L⁻¹ (89 %) and 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ (97 %) showed significant higher TBARS levels in the liver in relation to control in 5 days. In the first day, the liver also showed increase in TBARS levels between treatment 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 mg NH₃ L⁻¹ in relation to the control (66 %) and the same treatment in 5 day (71.4 %). TBARS levels in the same period, 5 days, in liver of silver catfish was significantly higher in treatment 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ in relation to 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 (82.2 %) and 0.18 mg NH₃ L⁻¹ (89.8 %)(Figure 1A).

The GST activity was significantly higher in the liver of silver catfish exposed to 120 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ in relation to control (133 % in 1day) and the same treatment (121.1 % in 5 days) (Figure 1B).

The CAT activity in the liver of silver catfish juveniles exposed to all treatments was significantly lower (around 222.2 %, except 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 mg NH₃ L⁻¹) in relation to control in 1 day. In silver catfish juveniles exposed to 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 and 0.18 mg NH₃ L⁻¹ occur a significant decrease (172.9 %) and increase (65.5 %) in CAT activity in 5 days in relation to control, respectively. Treatment 25 mg CaCO₃

$L^{-1} - 0.18 \text{ mg NH}_3 L^{-1}$ showed a significantly higher in the CAT activity in relation to others treatments in the same period, 5 days (1 C).

Juveniles exposed to 25 and 120 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1}$ (1 day) presented significantly lower and higher TBARS levels in all ammonia levels in relation to control (except 0.02 mg $\text{NH}_3 L^{-1}$) (195.2 and 157.9 %) and 2 (165.3; 202.1 and 87.7 %), respectively, in the gill. TBARS levels, in 5 days, showed a significant increase (132.6 and 685 %) in gill of juveniles exposed to 25 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.18 \text{ mg NH}_3 L^{-1}$ in relation to control and the same treatment in 1 day. Silver catfish exposed to 120 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.02$ and 0.18 mg $\text{NH}_3 L^{-1}$ showed a significant decrease in this values (145.1 and 122.7 %, respectively) in comparison to control and (481.8 and 272.7 %, respectively) the same treatment in 1 day. The exposition to 25 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1}$ in all ammonia levels were significantly lower in comparison to treatment 120 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1}$ in all ammonia levels in the same period for TBARS levels (1 day). Inverse occur in 5 days when juveniles exposed to 25 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.02$ and 0.18 mg $\text{NH}_3 L^{-1}$ presented an increase in these levels in comparison to 120 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.02$ (409.1 and 522.2 %, respectively) and 0.18 (177.8, and 209.1%, respectively) mg $\text{NH}_3 L^{-1}$ (2A).

In 1 day the GST activity presented a decrease (around 45 %) in silver catfish juveniles exposed to 25 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.50 \text{ mg NH}_3 L^{-1}$ in relation to 25 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.02$ and 0.18 mg $\text{NH}_3 L^{-1}$ and 120 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.02 \text{ mg NH}_3 L^{-1}$ (Figure 2B).

The GST activity in 1 day was significantly higher in silver catfish exposed to 25 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.50 \text{ mg NH}_3 L^{-1}$ (142.8 %) and 120 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1}$ in all ammonia levels (around 77.8 %) in comparison to control. In 5 days, there was a significant increase in treatment 25 and 120 mg $\text{CaCO}_3 L^{-1} - 0.18 \text{ mg NH}_3 L^{-1}$ in comparison to control (285.7 %) and 2 (128.6 %). GST activity in the gill of silver catfish, in the same

period, exposed to 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.02 and 0.18 mg NH₃ L⁻¹ (around 70 % in 1 day) and 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹ (5 days) were significantly lower and higher in comparison to others treatment, respectively (Figure 2B).

CAT activity in gill was significantly higher in 25 mg CaCO₃ L⁻¹ – 0.18 mg NH₃ L⁻¹, only in 5 days, in comparison to control (92.9 %) and to others treatments (73.1, 104.5 and 150.3 %) (Figure 2C).

4. Discussion

In the present study changes in the lipid peroxidation levels (TBARS), GST and CAT activity in the liver and gill of silver catfish were detected. The exposition of silver catfish juveniles to sub-lethal NH₃ levels, and water hardness cause restlessness and erratic swimming in the first hours after the exposition. The same was observed when silver catfish juveniles were exposed to high NH₃ levels in acute exposure (CL_{50-96h}) and growth experiments (Ferreira et al., 2013). In other work also was demonstrated that ammonia effects are immediate and cause swimming difficulties, oxygen consumption and ionic imbalance (Lemarié et al., 2004; Eddy, 2005).

Lethal concentration of un-ionized ammonia to silver catfish in pH 7.5 is 1.2 - 1.45 mg L⁻¹ (Miron et al. 2008; Ferreira et al., 2013). However, in this work was observed mortality from 0.18 mg NH₃ L⁻¹ that demonstrates a higher sensitivity of this species to low ammonia levels in animals with 60 - 120 g in relation to 1.85 – 11.0 g. Elevated ammonia levels cause an increase in plasmatic ammonia levels due to impair ammonia excretion or a net uptake of ammonia from the environment (Das et al., 2004). This situation is evident in others works with African catfish (*Clarias gariepinus*) (Ip et al., 2004; Schram et al., 2010), Nile tilapia (Hegazi et al., 2010) and Silver catfish

(Miron et al., 2008), were this conditions can lead to tissue hypoxia with consequently cellular death, which is demonstrated by lipid peroxidation. In our work is evident the lipid peroxidation to the end of experiment in the liver of silver catfish juveniles submitted to low water hardness $25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ and $0.18 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ in comparison to control . The same is observed in the gill of silver catfish exposed to $120 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ in all treatments were occurred an increase in lipid peroxidation in relation to control 2 in one day. Although, in fifth day these levels decreased to lower values in juveniles submitted to the same period and ammonia levels in $25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ and control 2 in relation to $120 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ - 0.02 and $0.18 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$. The increase in lipid peroxidation is also evident in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to low ($0.194 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$) and high ($0.588 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$) ammonia levels where levels increase 64 and 129 %; and 70 and 110 %, respectively, in liver and muscle (Hegazi et al., 2010). The influence of environmental temperature ($18 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 days) outside the species optimum interval and polluted site also results in increase, approximately 100 and 122%, of lipid peroxidation in muscle of seabass juveniles (*Dicentrarchus labrax*) (Vinagre et al., 2012) and liver of acar (*Geophagus brasiliensis*) (Wilhelm Filho et al., 2001), respectively. The increase of lipid peroxidation in liver and gills of silver catfish that occur in 5 days is probably due to low water hardness, because with highest hardness levels there is a decrease in their levels showing an effective water hardness protection in relation to intermediate ammonia levels ($120 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ – up to $0.18 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$). This statement can be supported by higher presence of Ca^{2+} in water, which decreases gill permeability (Tomasso et al., 1980; Baldisserotto, 2002), thereby decreasing the influence of environmental ammonia in silver catfish juveniles.

The GST activity showed an increase in liver of silver catfish exposed to 120 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ and 0.18 mg $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$ in relation to control 2, but in 5 days this enzyme decreased, returning to control levels. There was also a significant increase in GST activity in the gill of silver catfish when exposed to high ammonia levels and in both water hardness in one and five days after exposition. However, higher levels were evidenced in 25 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ and 0.18 mg $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$. In studies with aquatic pollutants, Nile tilapia exposed to chronic un-ionized ammonia (0.194 and 0.588 mg $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$)(Hegazi et al., 2010), silver catfish to thorium (25.3 and 69.2 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Correa et al., 2008), and manganese (3.88 mg L^{-1})(Gabriel et al., 2012) in liver; and brain of gold fish (*Carassius auratus*) to warm temperature in brain (Bagnyukova et al., 2007), also showed an increase in GST activity. Antioxidant enzyme activities can be used as biomarkers for contamination in aquatic ecosystems (Di Giulio et al., 1995; Regoli and Principato, 1995), because contaminants can increase the intracellular formation of ROS in aquatic organisms (Hegazi et al., 2010). GST is usually enhanced after exposure to different types of organic pollutants (Petrivalysk et al., 1997), being this enzyme part of an adaptive response to chemical stress (Hayes and Pulford, 1995). This fact was observed in our work because ammonia is a potential pollutant in aquatic environmental, having the GST an important role in the detoxification this pollutant in the aquatic organism.

Silver catfish exposed to 25 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ and 0.18 mg $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$ showed higher CAT activity, in liver and gill, in relation to control 1 and the same treatment in one day; and the others treatments in 5 days. Exposure of silver catfish to low water hardness and 0.18 mg $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$ generates an increase of H_2O_2 in consequence occur an increase in CAT levels. The same is observed in Nile tilapia exposed to chronic un-

ionized ammonia (0.194 and 0.588 mg NH₃ L⁻¹)(Hegazi et al., 2010), being this exposure similar to these work, where occur an increase in CAT activity in liver and muscle. In juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to 18 and 24 °C, for 30 days, the CAT activity in muscle showed higher levels in relation to control (0 day) (Vinagre et al., 2012). In gold fish, submitted to anoxia and reoxygenation (Lushchak et al., 2011); rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to hyperoxia (Ritola et al., 2002) and silver catfish to the cadmium (Pretto et al., 2011), also occur increase in the activities of liver catalase. The increase in catalase activity may have controlled the extent of oxidative damage induced by lipid peroxidation to a level that is physiologically tolerable for the organ, because this antioxidant enzyme provide the first line of cellular defense against toxic free radicals which cause oxidative stress (Hegazi et al., 2010). Hydroxyl radicals (*OH) are thought to be involved in the initiation and propagation of lipid peroxidation, but CAT activity also have pivotal roles in the removal of H₂O₂, avoiding tissue damage (Halliwell 2001). However, in silver catfish juveniles the CAT levels decrease in exposure to low oxygen levels (Riffel et al., 2011) and manganese (Gabriel et al., 2013), probably due to blockage of the electron chain transport or its low intensity operation. Partial reduction in oxygen molecules, diminishing also the production of hydrogen peroxide and consequently leads to a decrease in the activity of the enzyme (Lushchak and Bagnyukova 2007).

The results of this work demonstrate an enhance activities of antioxidant enzymes induced adaptive response in attempting to neutralize the oxidative effect of generated of reactive oxygen species. The effect most pronounced occurs in low water hardness (25 mg CaCO₃ L⁻¹) and high (0.50 mg NH₃ L⁻¹) ammonia levels, which are lethal in a short time regardless of water hardness. However, the enhanced of water

hardness ($120 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) present a protector effect against the ammonia toxicity for silver catfish when exposed to $0.18 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$. In conclusion, increase of water hardness is useful and promote the best condition to survival, besides reducing the action of reactive oxygen species in silver catfish juveniles when submitted to un-ionized ammonia in aquatic environmental.

5. References

- Altinok, I., Grizzle, J. M., 2004. Excretion of ammonia and urea by phylogenetically diverse fish species in low salinities. *Aquaculture* 238(1-4), 499–507.
- Bagnyukova, T., Lushchak, O., Storey, K., Lushchak, V., 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. *Journal of Thermal Biology* 32, 227-234.
- Becker, A.G., Baldisserotto, B., 2011. Waterborne ammonia and silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ciência Rural* 41(2), 349–353.
- Boveris, A, Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* 134, 707–716
- Boyd, C.E., 1998. Water quality management for pond fish culture: research and development. *International Center for Aquaculture and Aquatic Environments* .43, 1-37.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302–310.

- Chow, C.S., 1991. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 11, 215- 232.
- Colt, J., 2002. List of spreadsheets prepared as a complement (Available in <http://www.fisheries.org/afs/hatchery.html>). In: Wedemeyer GA (ed) *Fish hatchery management*, 2nd ed. American Fish Society Publication.
- Cooper, J.L., Plum, F., 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiological Reviews* 67, 440–519.
- Copatti, C.E., 2011. Interaction of water hardness and pH on growth of silver catfish , *Rhamdia quelen*, juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society* 42(4), 580–585.
- Copatti, C.E., Garcia, L.O., Becker, A.G., Kochhann, D., Cunha, M.A., Baldisserotto, B., 2011. Low water hardness and pH affect growth and survival of silver catfish juveniles. *Ciência Rural* 41(8), 1482–1487.
- Correa, L.M., Kochhann, D., Becker, A.G., Pavanato, M.A, Llesuy, S.F., Loro, V.L., Raabe, A., Mesko, M.F., Flores, E.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Biochemistry, cytogenetics and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. *Aquatic Toxicology* 88(4), 250–256.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K., Das, B.K., 2004. Acute toxicity of ammonia and its sublethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Resources* 35, 134-143.

- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism adaptation and toxicity. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environment Fate, and Risk. Assessment* Taylor and Francis, London, p.523–562.
- Dosdat, A., Ruyet, J.P., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., Roux, A., Lemarie, G., 2003. Effect of chronic exposure to ammonia on growth, food utilization and metabolism of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources* 16, 509–520.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater (21st ed), Centennial ed. Monrovia, CA.
- Ferreira, F.W., Cunha, R.B., Baldisserotto, B., 2013. The survival and growth of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*, exposed to different NH₃ and hardness levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 44 (2), 293-299.
- Eddy, F.B., 2005. Ammonia in estuaries and effects in fish. *Journal of Fish Biology* 67, 1495-1513.
- Flik, G., Verbost P.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1995. Calcium transport processes in fishes. Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation. Academic Press, San Diego, California, USA., p.317–341.
- Gabriel, D., Riffel, A.P.K., Finamor, I. A., Saccol, E.M.H., Ourique, G.M., Goulart, L.O., Kochhann, D., Cunha, M.A., Garcia. L.O., Pavanato, M.A., Val, A., Baldisserotto, B., Llesuy, S., 2013. Effects of subchronic manganese chloride exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) tissues: Oxidative stress and

- antioxidant defenses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64(4), 659-667.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Chippari-Gomes, A.R., Baldisserotto, B., 2000. *Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae)*. *Ciência Rural* 30(1), 179–185.
- Greenberg, A.E. et al., 1976. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Illinois: Bru-El, 1093.
- Habig, W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Halliwell B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59, 1609-1623.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York.
- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30, 445–600.
- Hegazi, M.M., Attia, Z.I., & Ashour, O.A., 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquatic Toxicology*, 99, 118–125.

- Ip, Y.K., Chew, S.F., Randall, D.J., 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. *Fish Physiology, Nitrogen Excretion*, vol. 20. Academic Press, San Diego, 109–148.
- Ip, Y.K., Subaidah, R.M., Liew, P.C., Loong, A.M., Hiong, K.C., Wong, W.P., Chew, S.F., 2004. The African catfish *Clarias gariepinus* does not detoxify ammonia to urea or amino acids during ammonia loading but is capable of excreting ammonia against an inwardly driven ammonia concentration gradient. *Physiological and Biochemical Zoology* 77, 255–266.
- Kosenko, E., Kaminsky, A., Valencia, M., Lee, L., Hermenegildo, C., Felipo, V., 1997. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radical Research* 27, 637–644.
- Lemarié, G., Dosdat, A., Covès, D., Dutto, G., Gasset, G., Person-Le Ruyet, J., 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 229, 479–491.
- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–269.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 148, 390-397
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Pike, T.W., Blount, J.D., Lindström, J., Metcalfe, N.B., 2011. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of*

Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 280, R100–R107.

Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, J., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32, 595–603.

McKenzie, D.J., Shingles, A., Taylor, E.W., 2003. Sub-lethal plasma ammonia accumulation and the exercise performance of salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 135, 515–526

Miron, D.S, Moraes, B.S, Becker, A.G, Crestani, M., Spanevello, R., Loro, V.L, Baldisserotto, B. 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture* 277(3-4), 192–196.

Person-Le, Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A., Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154, 155–171.

Petrivalsky, M., Machala, M., Nezveda, K., Piacka, V., Svobodova, Z., DrabeK, P., 1997. Glutathione dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: search for specific biomarkers of chemical stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1417–1421.

Pretto, A.; Loro, V.L.; Baldisserotto, B.; Pavanato, M.A.; Moraes, B.S.; Menezes, C.; Cattaneo, R.; Clasen, B.; Finamor, I.A.; Dressler, V., 2011. Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60(2), 309–18.

- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1-12), 17–23.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31, 143–164.
- Riffel, A.P.K., Garcia, L.O., Finamor, I. A, Saccol, E.M.H., Meira, M., Kolberg, C., Horst, A, Partata, W., Llesuy, S., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2011. Redox profile in liver of *Leporinus macrocephalus* exposed to different dissolved oxygen levels. *Fish Physiology and Biochemistry* 1, 2012.
- Ritola, O., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Lindstrom-Seppa, P., 2002. Effects of in vitro exposure to ozone and/or hyperoxia on superoxide dismutase, catalase, glutathione and lipid peroxidation in red blood cells and plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 33(3), 165–175.
- Russo, R.C., Thurston, R.V., 1991. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. Aquaculture and water quality. In: *Advances in World Aquaculture*. Brune, E. and Tomasso, J.R. (Editors), WAS Publication 3, 58-59
- Schram, E., Roques, J.A.C., Abbink, W., Spanings, T., De Vries, P., Bierman, S., De Vis, H. Van., 2010. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 306(1-4), 108–115.

- Tomasso, J.R., Goudie, C.A., Simco, B.A., Davis, K.B., 1980. Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 109, 229–234.
- Townsend, C.R., Baldisserotto, B., 2001. Survival of silver catfish juveniles exposed to acute changes of water pH and hardness. *Aquaculture International* 9, 413–419.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M., 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators* 23, 274–279.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Diamant, A., Popper, D.M., 1993. Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. *Journal of Fish Biology* 42, 321–328.
- Weirich, C.R., Tomasso, J.R., Smith, T.I.J., 1993. Toxicity of ammonia and nitrite to Sunshine Bass in selected environments. *Journal of Aquatic Animal Health* 5, 64–72.
- Wicks, B.J., Randall, D.J., 2002. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 132(2), 275–85.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.A., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses in the cichlid fish acar (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34 (5), 719–726.

Wilkie, M.P., 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *The Journal of Experimental Zoology* 293(3), 284–301.

Wood, C.M., 2004. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: is exogenous ammonia a growth stimulant in fish? *Journal of Experimental Biology* 207, 2043- 2054.

Table 1. Physicochemical parameters of water and mortality in the experimental tanks.

Treatments	Physicochemical Parameters				Mortality (%)
	T (°C)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Nitrite	
25 mg CaCO ₃ L ⁻¹	22.1±	6.73±	7.60±	0.03±	2.56±
0.02 mg NH ₃ L ⁻¹	0.14	0.08	0.03	0.03	2.56
25 mg CaCO ₃ L ⁻¹	22.2±	6.51±	7.65±	0.01±	63.9±
0.18 mg NH ₃ L ⁻¹	0.10	0.14	0.04	0.03	9.4
25 mg CaCO ₃ L ⁻¹	22.9±	6.36±	7.54±	0.06±	100
0.50 mg NH ₃ L ⁻¹	0.23	0.08	0.03	0.03	
120 mg CaCO ₃ L ⁻¹	22.3±	6.68±	7.36±	0.01±	3.84±
0.02 mg NH ₃ L ⁻¹	0.16	0.12	0.08	0.004	3.84
120 mg CaCO ₃ L ⁻¹	22.0±	6.65±	7.61±	0.02±	57.6±
0.18 mg NH ₃ L ⁻¹	0.12	0.08	0.03	0.03	9.5
120 mg CaCO ₃ L ⁻¹	22.7±	6.49±	7.49±	0.01±	100
0.50 mg NH ₃ L ⁻¹	0.25	0.14	0.04	0.02	

Figure 1 – TBARS, GST and CAT activity in liver as a function of exposition time (days) in silver catfish juveniles exposed to different un-ionized ammonia and water hardness. Values are expressed as means \pm SEM. $N = 9$. Different lower case letters indicate significant differences among treatments over the same time period. Different capital letters indicate significant differences in the same treatment throughout the experimental period (days). Bars that are not shown in the graphs are due to a lack of recordable activity. Tests were performed by two-way ANOVA and test of Dunnet ($P < 0.05$).

Figure 2 – TBARS, GST and CAT activity in gills as a function of exposition time (days) in silver catfish juveniles exposed to different un-ionized ammonia and water hardness. Values are expressed as means \pm SEM. $N = 9$. Different lower case letters indicate significant differences among treatments over the same time period. Different capital letters indicate significant differences in the same treatment throughout the experimental period (days). Bars that are not shown in the graphs are due to a lack of recordable activity. Tests were performed by two-way ANOVA and test of Dunnet ($P < 0.05$).

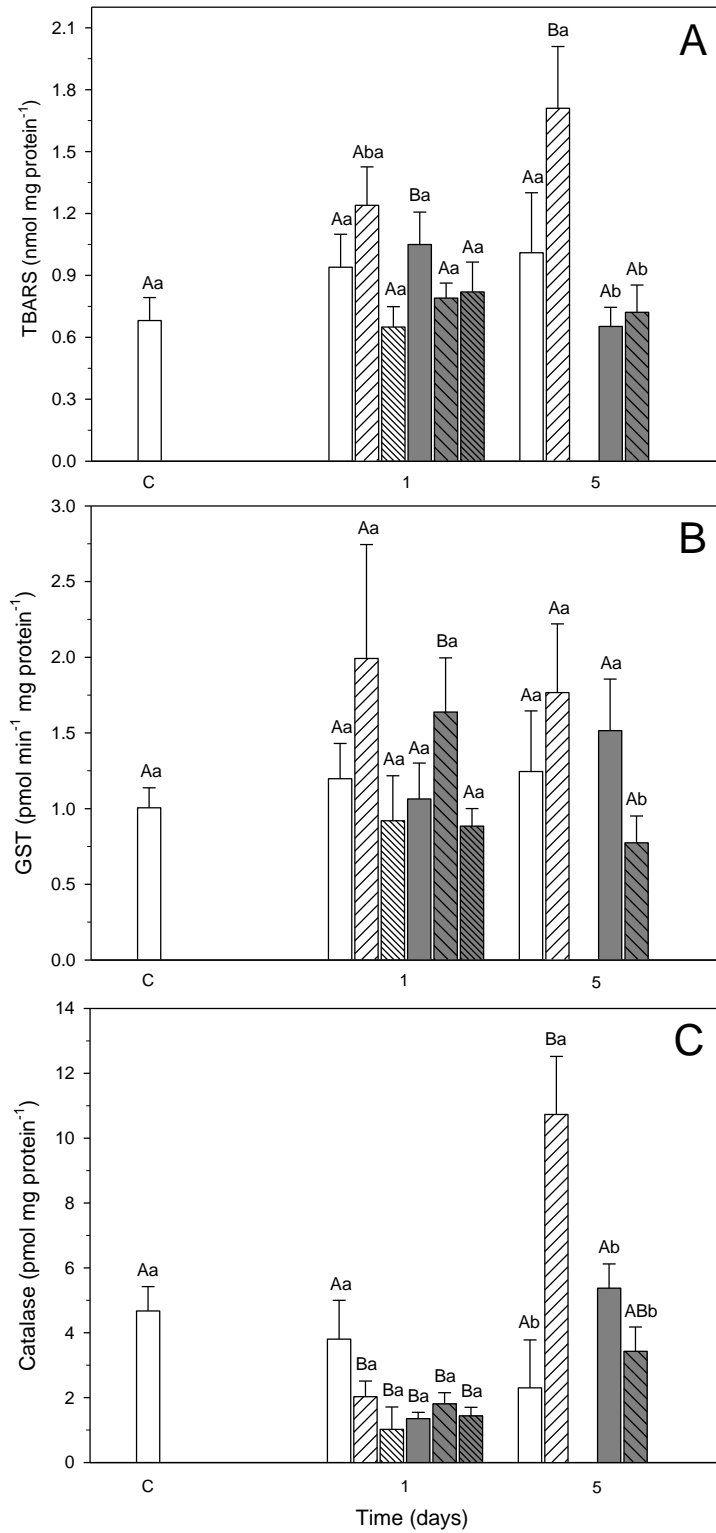


Figure 1

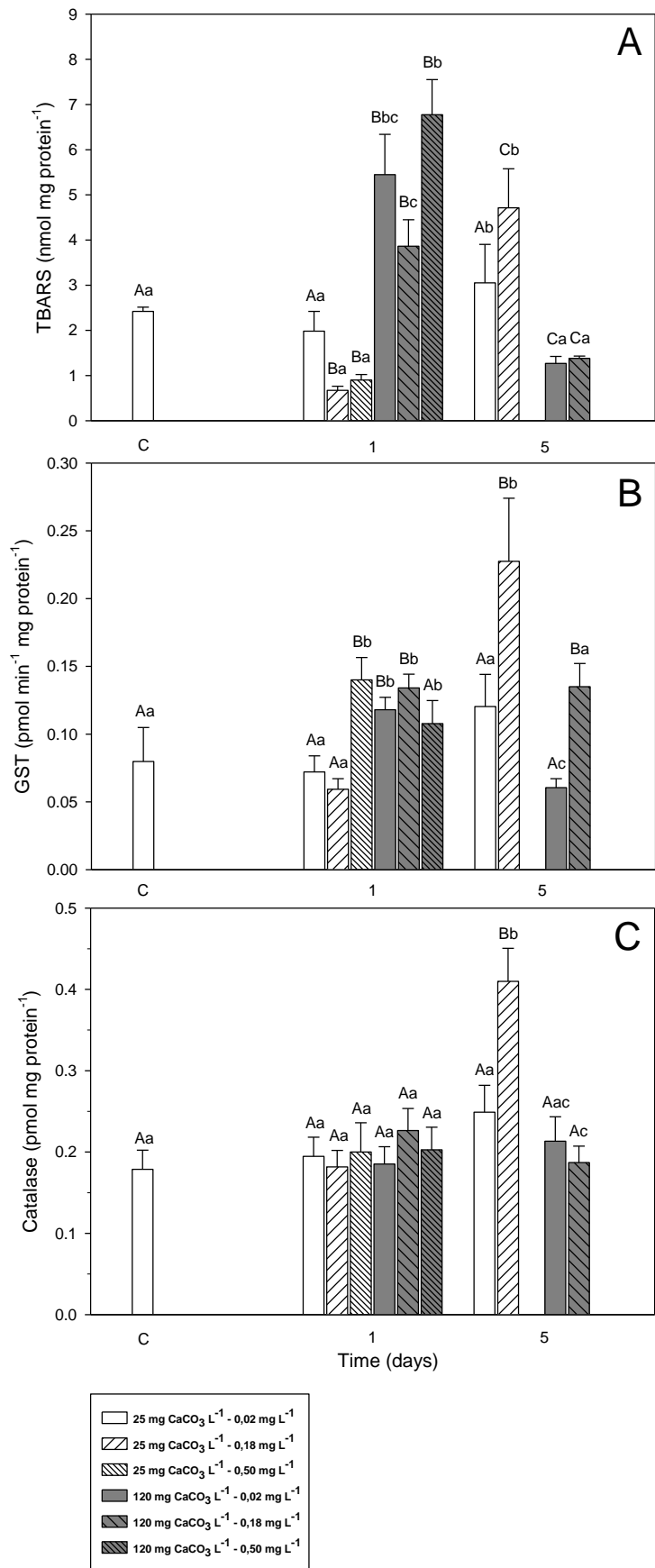


Figure 2

Conclusões Gerais

- Os maiores níveis de dureza na água não são capazes de evitar a mortalidade em animais expostos à concentrações extremas de amônia não-ionizada, porém tem efeito benéfico melhorando o status oxidativo dos animais.
- Juvenis de jundiá expostos a alta dureza, $125 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, são beneficiados, pois os mesmo apresentam uma melhora no seu status oxidativo quando submetidos as maiores concentrações de amônia não-ionizada na água, proporcionando aos animais melhores condições fisiológicas para enfrentar situações de lipoperoxidação e estresse oxidativo.