

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA**

**Certificado de vigor físico para o tambaqui
(*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818)**

Márcio Soares Ferreira

**Manaus – AM
2006**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**

Márcio Soares Ferreira

**Certificado de vigor físico para o tambaqui
(*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818)**

**Dissertação apresentada ao
Programa Integrado de Pós-
graduação em Biologia Tropical
de Recursos Naturais do
convênio INPA/UFAM, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de
concentração em Biologia de
Água Doce e Pesca Interior.**

**Orientador: Adalberto Luís Val, Dr.
Financiamento: PRONEX, FAPEAM, CNPq**

**Manaus – AM
2006**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a coragem necessária para enfrentar todas as incertezas da vida.

Ao meu orientador, Dr. Adalberto Luís Val, pelos seus grandiosos ensinamentos sobre fisiologia de peixes, pesquisa científica, postura e ética.

À equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM, por todo o apoio necessário a realização deste trabalho.

Ao Rafael e a Vivian, pela incessante vontade de colaborar com o trabalho alheio.

Ao Centro de Medicina Nuclear - CENUSA, por ter cedido sua estrutura para a realização de parte das análises.

A CAPES, por financiar minha bolsa de estudos neste período.

Ficha Bibliográfica

Ferreira, Márcio Soares

Certificado de vigor físico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*; Cuvier, 1818) / Márcio Soares Ferreira. -- 2006.

x f.

Dissertação (mestrado)--INPA/UFAM, Manaus, 2006.

1. Tambaqui - Fisiologia I. Título

CDD 597.5041

SINOPSE

Este trabalho mediu parâmetros fisiológicos usados como indicadores de estresse em tambaquis submetidos a três situações estressantes, separadamente: hipoxia, pH baixo e alta concentração de amônia gasosa. Foi sugerida a velocidade crítica de natação (U_{crit}) mínima, considerada segura para o manejo e comercialização da espécie.

RESUMO

Certificado de vigor físico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*; Cuvier 1818)

Pelo menos 64 espécies de peixes são cultivadas no Brasil, sendo que na região norte, as principais são: tambaqui (*Colossoma macropomum*), matrinxã (*Brycon amazonicum*) e pirarucu (*Arapaima gigas*). O tambaqui, influenciado pela grande demanda e alto rendimento, é cultivado com sucesso no Brasil, Equador, Panamá, Peru, Venezuela e Colômbia. Um dos principais problemas relacionados à criação desta espécie é a alta mortalidade causada por estresse de manejo e transporte inadequados. As respostas fisiológicas do organismo ao estresse são inúmeras e dependem do tipo e da intensidade do agente estressor. O desempenho natatório (Ucrit) dos peixes está diretamente relacionado à sua capacidade de transferir oxigênio e moléculas energéticas aos músculos, e ao mesmo tempo, eliminar os subprodutos indesejáveis. A medida da Ucrit dos peixes de piscicultura ou ornamentais pode ser utilizada como um indicador de estresse, com a vantagem de ser um método não invasivo, de relativo baixo custo e fácil verificação. Os lotes de peixes poderiam ser acompanhados e, se considerados debilitados, não seriam comercializados e nem manejados, até que o estado fisiológico normal fosse restabelecido. Este trabalho demonstrou que exposição prévia de tambaquis a hipoxia, diminuiu sua Ucrit devido ao acúmulo de lactato nos músculos, sendo que um período de 96 horas de recuperação não foi suficiente para restabelecer sua Ucrit e metabolismo normais. Ao contrário, a exposição a pH baixo e a amônia gasosa não causaram produção de lactato, mas diminuíram a Ucrit dos tambaquis devido a perda de sódio plasmático com conseqüente hemoconcentração e perda da capacidade aeróbica. A diferença está no efeito neurotóxico da amônia, que em um segundo momento, impediu completamente a contração muscular dos peixes. Em ambos os casos, um período de 96 horas de recuperação foi suficiente para restabelecer sua Ucrit e metabolismo normais. Com base nas situações de estresse utilizadas neste estudo, sugere-se que a velocidade crítica de natação mínima para o manejo e comercialização desta espécie seja a partir de 5,4 comprimentos de corpo por segundo.

ABSTRACT

Physical capacity certificate to tambaqui (*Colossoma macropomum*; Cuvier 1818)

At least 64 fish species are reared in Brazil, and the major ones raised in the north are tambaqui (*Colossoma macropomum*), matrinxã (*Brycon amazonicum*), and pirarucu (*Arapaima gigas*). Tambaqui is by far the most studied fish species, as a consequence of its great demand and high revenue. Tambaqui is successfully raised in Brazil, Ecuador, Panama, Peru, Venezuela and Colombia. One of the main problem related to the farming of this species is the high mortality caused by handling stress and inadequate transport. The physiological answers of the organism to the stress are countless and they depend on the type and on the intensity of the stress agent. The swimming performance (Ucrit) of the fish is directly related to its capacity to transfer oxygen and energy molecules to the muscles, and at the same time, to eliminate the undesirable by-products. The Ucrit measure of farming and ornamental fish can be used as a useful stress indicator, with the advantage of being a non invasion method, of relative low cost and easy verification. The fish lots could be accompanied and, if considered weakened, they should neither be marketed nor be handled, until that normal physiological state be reestablished. This work demonstrated that previous exposure of tambaquis to hypoxia, reduced its Ucrit due to lactate accumulation in their muscles, and a period of 96 hours of recovery was not enough to reestablish the Ucrit and normal metabolism. Nevertheless, exposure to low pH and gaseous ammonia didn't cause lactate accumulation, but they reduced Ucrit of the tambaquis due to loss of plasma sodium, with consequent hemoconcentration and decrease of the aerobic capacity. The difference is the neurotoxic effect of ammonia, wich in a second moment affect muscular contraction of the fish. In both cases, a period of 96 hours of recovery was enough to reestablish the Ucrit and normal matabolism. Based on the stress situations used in this study, it is suggested that the minimum Ucrit for the handling and commercialization of this species is above of 5,4 body lengths per second.

1. Introdução	1
1.1. Estresse em peixes	2
1.2. Agentes estressores	2
1.3. Fisiologia do estresse	4
1.3.1. Hipoxia	4
1.3.2. Amônia	5
1.3.3. pH	6
1.4. Respostas fisiológicas ao estresse	6
1.5. Natação sob estresse	7
1.6. Objetivos	9
1.6.1. Objetivo geral	9
1.6.2. Objetivos específicos	9
2. Material e métodos	10
2.1. Recepção e recuperação dos animais	10
2.2. Protocolo experimental	10
2.3. Análises hematológicas	13
2.4. Teste da velocidade crítica de natação (Ucrit)	15
2.5. Análise estatística	16
3. Resultados	17
3.1 Hipoxia	17
3.2 pH	25
3.3 Amônia	32
3.4 Agrupamento dos dados obtidos	39
4.1 Hipoxia	40
4.2 pH	43
4.3 Amônia	45
5. Conclusões	48

1. Introdução

A criação de peixes iniciou-se, provavelmente, na Ásia com os chineses, mas os registros mais completos são de criações de carpas na Europa entre os anos de 500 e 1700. A piscicultura foi inicialmente introduzida na América por volta de 1877, nos Estados Unidos, e em 1904, apareceram os primeiros registros desta prática no Brasil, conduzida pelo então secretário da agricultura Carlos Botelho (Azevedo, 1972). Segundo Roubach e colaboradores (2003), pelo menos 64 espécies de peixes são cultivadas no Brasil, sendo que na Região Norte, as principais são o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o matrinxã (*Brycon amazonicum*) e o pirarucu (*Arapaima gigas*).

O tambaqui, influenciado pela sua grande demanda e alto rendimento, é cultivado com sucesso no Equador, no Panamá, no Peru, na Venezuela e na Colômbia (Val & Honczaryk, 1995; Gomes *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003). Pertence à família Characidae e é uma espécie nativa dos rios Amazonas, Orinoco e seus efluentes. É uma espécie onívora, podendo atingir até 90 cm de comprimento e tem alto valor comercial (Ferreira *et al.*, 1998).

Um dos principais problemas relacionados à criação desta espécie é a alta mortalidade causada por estresse durante o manejo e transporte inadequados. Os piscicultores percebem apenas a mortalidade imediata decorrente do estresse, mas não percebem os efeitos posteriores, como por exemplo, produção reduzida (Gomes *et al.*, 2002).

1.1. Estresse em peixes

Selye, em 1950, definiu estresse como “a soma de todas as respostas fisiológicas por meio da qual o animal tenta manter ou restabelecer o metabolismo normal frente a forças químicas ou físicas” (revisto por Wedemeyer *et al.*, 1990). Wedemeyer (1990) definiu estresse como “a resposta de um organismo a qualquer exigência imposta a ele, que cause extensão do estado fisiológico além da faixa normal de repouso”. Este autor diz que o estresse pode ser “adaptável”, quando o organismo pode adaptar-se e viver indefinidamente naquela condição estressante, ou “mal-adaptável”, quando o estresse leva o organismo a morte mais cedo ou mais tarde. (Wedemeyer *et al.*, 1990)

As respostas dos peixes ao estresse podem ser divididas em três momentos: i) respostas primárias, com baixa relevância ecológica, ocorre quando, imediatamente após a percepção do agente estressor, há a liberação de hormônios no sangue; ii) respostas secundárias, com média relevância ecológica, quando o animal apresenta distúrbios fisiológicos, e iii) respostas terciárias, com alta relevância ecológica, que podem afetar o crescimento, a resistência a doenças, a reprodução, e culminar com um declínio populacional (Wedemeyer *et al.*, 1990; Wedemeyer, 1997; Val *et al.*, 2004).

1.2. Agentes estressores

A tabela I, modificada de Val e colaboradores (2004), lista diversos agentes estressores que podem atingir os peixes em geral. Embora sejam inúmeros, na piscicultura apenas alguns são relatados com maior frequência. Waichman e colaboradores (2001) acompanharam o transporte de peixes

ornamentais de Barcelos - AM até a sede do exportador em Manaus - AM e verificaram indícios de estresse nos peixes decorrentes, provavelmente, de alterações na qualidade da água como excesso de amônia, temperatura elevada, queda no pH e níveis baixos de oxigênio dissolvido.

Tabela I. Agentes estressores separados por classe (modificado de Val *et al.*, 2004)

Classes	Agentes estressores
1. Estressores químicos	oxigênio pH amônia e nitrito metais de transição arsênio, cloro, cianeto, fenóis inseticidas, herbicidas, fungicidas desfoliantes cátions e ânions
2. Estressores biológicos	Hierarquia agressão, territorialidade, espaço físico microorganismos patogênicos ou não parasitas internos e externos privação alimentar
3. Estressores físicos	temperatura luminosidade som gases dissolvidos
4. Estressores de manejo	confinamento tratamento de doenças transporte densidade populacional

1.3. Fisiologia do estresse

Os agentes estressores alteram o estado fisiológico do organismo, tirando-os do seu equilíbrio e colocando-os em “estado de estresse”. No entanto, cada agente estressor possui um mecanismo específico de atuação, como relatado para alguns deles, a seguir.

1.3.1. Hipoxia

O oxigênio em baixas concentrações na água é considerado um importante fator de estresse na piscicultura (Wedemeyer, 1997). Em seres vivos, é utilizado para a produção de ATP (Hochachka, 1991). O oxigênio é transferido para as células por meio de quatro passos principais: ventilação branquial, difusão branquial, transporte de oxigênio no sangue e difusão tissular (Perry & McDonald, 1993).

Na Amazônia, muitos peixes possuem mecanismos de ajuste para sobreviver em situações de hipoxia, como por exemplo, desenvolvimento de lábios inferiores, mudanças nas taxas de ventilação, mudanças nos parâmetros circulatórios e sangüíneos, como aumento na quantidade de células vermelhas, diminuição dos níveis de fosfatos intra-eritrocitários e ajustes no pH intracelular (Almeida-Val *et al.*, 1993; Val, 1995, 1996; Val *et al.*, 1998). Nesta situação, a utilização do metabolismo anaeróbico e a conseqüente produção de lactato, diminui demasiadamente o pH plasmático (Wedemeyer, 1997). Essa queda do pH resultaria, em tese, numa diminuição do pH intra-eritrocitário, o que afetaria a afinidade da hemoglobina com o oxigênio (Brauner & Jensen, 1999). Entretanto, a ação das catecolaminas (ex: adrenalina e nor-adrenalina), hormônios típicos

de estresse, impede que isso aconteça (para uma revisão veja Randall & Perry, 1992). Uma das funções das catecolaminas é ativar as bombas de troca que retiram H^+ intra-eritrocitário em troca de sódio plasmático. Assim o pH interno aumenta, e a Anidrase Carbônica, presente apenas no interior dos eritrócitos, causa, por meio do ciclo de Jacob-Stewart, desequilíbrio na proporção CO_2/HCO_3^- , garantindo que o pH interno seja desacoplado do externo (Lessard *et al.*, 1995; Perry *et al.*, 1999).

1.3.2. Amônia

A amônia é resultante da oxidação biológica de aminoácidos e proteínas e pode apresentar-se como gás (NH_3) ou como íon (NH_4^+), sendo a concentração da forma gasosa diretamente proporcional ao pH e à temperatura do meio. Segundo Wilson e colaboradores (1994), a maior parte, se não a totalidade da amônia, pode ser excretada na forma gasosa. No entanto, trabalhos recentes indicam que a troca eletricamente neutra Na^+/NH_4^+ , ou ainda difusão de NH_4^+ podem ter importante participação no processo de excreção (Salama *et al.*, 1999; Kelly & Wood, 2001).

Altas concentrações de amônia ambiental, na forma NH_3 , causam reversão no fluxo, intoxicando os peixes pela atuação no sistema nervoso central (Randall & Tsui, 2002). O pH levemente ácido, que transforma o gás em NH_4^+ , torna a amônia pouco tóxica. Altas concentrações de NH_4^+ na água podem evitar a reversão do gradiente de difusão de NH_3 e, adicionalmente, os íons H^+ em excesso forçam a extrusão de mais NH_3 do plasma (Wood, 1993). Wilson e colaboradores (1994) alegam que a maior parte da amônia é excretada na forma

gasosa, auxiliada pela fina camada de água ácida (*boundary layer*) formada pela excreção de CO₂.

1.3.3. pH

O pH atua principalmente em nível branquial, impedindo uma correta regulação iônica e a manutenção do equilíbrio ácido-base nos peixes. Os modelos atuais de captura de íons apontam para a utilização de uma proteína apical de troca Cl⁻/HCO₃⁻ eletricamente neutra e dois mecanismos de troca Na⁺/H⁺, sendo um eletricamente neutro, dirigido por proteínas de troca, e o outro energizado por uma bomba apical de prótons H⁺, que cria um potencial negativo nas células e dirige a entrada de Na⁺ (Lin & Randall, 1993; Wilson *et al.*, 2000). Um modelo alternativo para a captura de sódio seria a troca não obrigatória Na⁺/NH₄⁺, porém com a maior parte da amônia sendo eliminada por difusão branquial (Salama *et al.*, 1999). Na piscicultura, principalmente durante procedimentos de transporte, é muito mais comum ocorrer queda no pH do que sua elevação. O bloqueio da captura de sódio em pH ácido pode ser explicado pelo efeito competitivo do H⁺ nos transportadores eletricamente neutros (Potts, 1994) ou pelo aumento do gradiente para a extrusão de H⁺ pelas bombas de prótons (Lin & Randall, 1991). Adicionalmente, o pH ácido pode alterar a integridade das junções paracelulares, causando perda de íons (Madara, 1988).

1.4. Respostas fisiológicas ao estresse

As respostas fisiológicas do organismo ao estresse são inúmeras e dependem do tipo e da intensidade do agente estressor. O quadro I, modificado de Barton e colaboradores (2002), mostram vários parâmetros fisiológicos que

podem ser alterados em situações de estresse. Segundo Wedemeyer e colaboradores (1990), as alterações fisiológicas que ocorrem nos peixes podem ser utilizadas como índice mensurável da severidade do estresse.

Heat-shock proteins	Neurotransmissores cerebrais
Catecolaminas plasmáticas	Cortisol plasmático
Glicose plasmática	Lactato plasmático
Glicogênio tissular	Cloreto plasmático
Sódio plasmático	Osmolalidade plasmática
Proteínas plasmáticas	Hematócrito
Leucócrito	Hemoglobina

Quadro I. Indicadores de estresse (modificado de Barton e colaboradores, 2002)

1.5. Natação sob estresse

Durante a natação, os peixes utilizam diversos estilos que envolvem uma combinação da ação do músculo-propulsor com o comportamento. Esta combinação varia de acordo com a velocidade e a duração requerida. Em baixas velocidades, os peixes utilizam-se principalmente dos músculos vermelhos, que são aeróbicos e, em velocidades mais altas, utilizam-se principalmente dos músculos brancos, essencialmente anaeróbicos (Hammer, 1995; Burgetz *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2003; Peak & Farrel, 2004).

O desempenho natatório dos peixes está diretamente relacionado à sua capacidade de transferir oxigênio e moléculas energéticas aos músculos, e ao mesmo tempo, eliminar os subprodutos indesejáveis (Webb, 1998). A Ucrit

(velocidade crítica de natação, Brett, 1964) é uma medida da capacidade aeróbica do animal, com uma maior participação do metabolismo anaeróbico, próxima à sua velocidade de fadiga (Hammer, 1995; Burgetz *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2003; Peak & Farrel, 2004).

A medida da Ucrit dos peixes de piscicultura ou ornamentais pode ser utilizada como um indicador de estresse, com a vantagem de ser um método não invasivo, de custo relativamente baixo e de fácil verificação. Os lotes de peixes poderiam ser acompanhados e, se considerados debilitados, não seriam comercializados e nem manejados, até que o estado fisiológico normal fosse restabelecido. A certificação da qualidade dos produtos é hoje uma necessidade, dada a atual expansão da piscicultura e as exigências cada vez maiores dos mercados consumidores. A FAO – Food and Agriculture Organization assinala que a aqüicultura mundial movimentou em 2000 cerca de US\$ 56,5 bilhões. Mais da metade da produção advinda da aqüicultura mundial foi peixe, sendo que o número de espécies cultivadas aumenta cada vez mais. Tratando-se de peixes ornamentais, de 350 a 400 milhões de exemplares são comercializados anualmente no mundo, gerando uma movimentação financeira de US\$ 321 milhões. O estado do Amazonas exporta cerca de 20 milhões de peixes ornamentais por ano, gerando uma receita direta de US\$ 3 milhões e empregando dez mil trabalhadores diretos e indiretos (Chao, 2001). Visto a importância da criação de peixes para o estado, o desenvolvimento de um túnel de natação e de protocolos para atestar o vigor físico dos peixes, seria de grande importância para a atividade.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral contribuir com o desenvolvimento de protocolos para certificar o vigor físico do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

1.6.2. Objetivos específicos

- 1) Verificar como os agentes estressores hipoxia, excesso de amônia e pH baixo interferem no estado fisiológico do tambaqui;
- 2) Verificar a relação entre estado fisiológico e *Ucrit* dos peixes;
- 3) Sugerir valores apropriados de *Ucrit* para o manejo e comercialização da espécie.

2. Material e métodos

2.1. Recepção e recuperação dos animais

Os exemplares de tambaqui foram adquiridos de piscicultores da região e, ao chegarem ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), no INPA, passaram por tratamento profilático convencional. Os animais foram então aclimatados por no mínimo 30 dias e alimentados duas vezes ao dia (2% da biomassa por administração) com ração comercial granulada (Nutripeixe, Brasil, proteína bruta 36%, fibra 7%, extrato etéreo 4%, umidade 13%, matéria mineral 14%, cálcio 2,5% e fósforo 0,6%).

2.2. Protocolo experimental

Vinte e quatro câmaras escuras com capacidade para dois litros de água cada foram utilizadas em todos os experimentos, obedecendo às orientações sobre densidade de estocagem de tambaquis durante a recria, sugerida por Brandão e colaboradores (2004). Metade das câmaras (12) foi utilizada para acomodar o grupo controle e a outra metade (12) para o grupo experimental. Cada câmara recebeu um único peixe e todas elas receberam aeração constante por meio de mangueiras de ar e pedra porosa (exceto no experimento de hipoxia). Todas as câmaras tiveram 60% da água trocados a cada 12 horas, em sistema semi-estático. As características físico-químicas da água utilizada foram as seguintes:

Tabela 2. Características físico-químicas da água proveniente de poço artesiano referido como “controle” nas quais os experimentos foram realizados. Os valores são expressos como média \pm SEM de cinco amostras. * Após aeração para remoção de CO₂.

Parâmetro	Controle (INPA)
Na ⁺	34,00 \pm 1,00 μ mol
Cl ⁻	28,00 \pm 1,00 μ mol
Ca ²⁺	11,50 \pm 0,90 μ mol
Mg ²⁺	0,80 \pm 0,10 μ mol
K ⁺	15,50 \pm 0,40 μ mol
pH	6,32 \pm 0,04
SH	0,99 \pm 0,19 mg C.L ⁻¹
O ₂ Dissolvido *	5,91 \pm 0,07mg.L ⁻¹
Temperatura	28,00 \pm 1,00°C

Metade do grupo controle (n=6) e metade do grupo experimental (n=6) tiveram os parâmetros hematológicos analisados após 12 horas nas câmaras, e o restante dos peixes do grupo controle (n=6) e do grupo experimental (n=6), passaram antes pelo teste de Ucrit para então terem o sangue analisado. Os exemplares de tambaqui foram então descartados e, novos tambaquís foram utilizados em cada um dos seguintes períodos de tempo: 24, 48 e 96 horas. Por fim, o experimento com exposição por 96 horas foi repetido, com novos peixes,

mas foram recuperados em ambiente igual ao controle (*recovery*) por 96 horas antes de serem analisados.

Experimento I - Hipoxia

Os exemplares utilizados tinham $10,77 \pm 0,53$ cm (CP) e $33,74 \pm 6,25$ g. As doze câmaras do grupo experimental tiveram a aeração desligada e os peixes foram então analisados nos períodos de tempo estipulados. Embora a água adicionada na troca parcial contivesse algum oxigênio, este era logo consumido, visto que os peixes se mantinham na superfície e com os lábios expandidos. Durante o experimento de hipoxia, as parte inferiores da câmara não apresentaram níveis de oxigênio detectáveis pelo eletrodo e, na lâmina superficial da água, os níveis de oxigênio detectados oscilaram muito rapidamente entre 0,5 e 1 mg/L. Para testar o *recovery*, a aeração foi novamente ligada e a quantidade de oxigênio foi mantida em, aproximadamente, 6,0 mg/L.

Experimento II – Amônia

Os exemplares analisados tinham $11,89 \pm 0,64$ cm (CP) e $34,57 \pm 5,41$ g. Foi adicionado nas câmaras do grupo experimental 1,4 g de cloreto de amônio e 0,5 mL de tampão fosfato 1,0M, para manter o pH em 6,0. A temperatura foi mantida em 28°C, usando-se um aquecedor em sistema de banho-maria e um ventilador, obtendo-se assim uma concentração de amônia gasosa de 0,3 mg/L. A troca parcial de água foi feita com solução previamente preparada contendo a concentração desejada de amônia e tampão, ou somente tampão. Para o teste

de *recovery*, foi adicionada água pura às câmaras, ainda com tampão fosfato, até a diluição da amônia para níveis insignificantes.

Experimento III – pH

Os exemplares analisados tinham $10,51 \pm 0,69$ cm (CP) e $35,83 \pm 5,32$ g. Foi adicionado ácido sulfúrico nas câmaras do grupo experimental, até que o pH baixasse de 6,0 aproximadamente, para 3,7. A troca parcial de 60% foi feita com solução previamente preparada de mesmo pH. Medições do pH imediatamente antes de cada troca parcial, apresentaram valores médios de $4,0 \pm 0,3$. Para o teste de *recovery*, a água das câmaras foi diluída com água pura, de pH 6,0.

2.3. Análises hematológicas

O sangue foi coletado da veia caudal por meio de seringas heparinizadas. Para todos os animais do grupo controle e dos grupos experimentais, antes e depois da exposição ao túnel de natação, foram estimados os seguintes parâmetros regularmente influenciados por agentes estressores:

a) Cortisol, determinado por enzima imunoensaio, onde há a competição entre o cortisol da amostra e o cortisol marcado com enzima quimioluminescente. A quantidade de cortisol é inversamente proporcional a quantidade de luz emitida pelo conjugado, que foi lida no equipamento Imulite[®] (DPC-Méd-Lab).

b) Glicose, determinada por meio ensaio enzimático colorimétrico, cujo princípio consiste em adicionar o plasma em uma solução contendo tampão fosfato,

aminoantipirina p-hidroxibenzoato e as enzimas glicose oxidase e peroxidase na proporção de 1:100. Foi utilizado o kit comercial Glucox 500 (Doles®).

c) Lactato, segundo procedimento técnico da Sigma Chemical Co. (“kit” nº. 826 UV) no qual a amostra é adicionada a uma solução contendo, numa mistura, a enzima lactato desidrogenase (LDH, 100UI/ml), a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), hidrazina e tampão glicina (0,6 mol/L, pH 9,2). Neste método, a enzima converte o lactato, presente no extrato de plasma, a piruvato o qual é complexado a piruvato-hidrazina, evitando a reconversão do piruvato para lactato. A reação ocorre com redução simultânea da coenzima NAD^+ e é monitorada através do decréscimo da absorbância em 340nm, decréscimo este proporcional à concentração original de lactato na amostra.

d) Sódio e potássio, determinados por meio de espectrofotometria de absorção atômica (Perkin Elmer AAnalyst 800), onde a amostra é queimada e os átomos de interesse são reduzidos ao estado não excitado, sendo assim capazes de absorver luz a um comprimento de onda específico.

e) Hematócrito (Ht), determinado por meio da técnica de microhematócrito, usando tubos capilares em uma centrífuga FANEM 211N, Brasil, a 12000 rpm durante 10 minutos. A leitura da taxa de sedimentação foi feita em cartão padronizado.

f) Concentração de hemoglobina [Hb], determinada pelo método da cianometahemoglobina (Kamper & Zijlstra, 1964), que consiste em diluir 10µl de sangue em 2 mL de solução Drabkin, sendo a absorbância determinada em 540 nm em um espectrofotômetro Genesys 2. A fórmula para determinação da taxa de hemoglobina é a seguinte:

$$\text{g \% Hb} = A_{540} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra}$$

g) Número de células vermelhas (Red Blood Cell: RBC), determinado a partir da diluição do sangue em formol citrato na proporção de 1:200. A contagem dos eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer sob objetiva de 40X em um microscópio Motic B5 Professional. Os resultados foram apresentados como números de eritrócitos/mm³.

h) Constantes corpusculares, foram determinadas de acordo com Brown (1976), como segue:

$$\text{Volume corpuscular médio (VCM; } \mu\text{m}^3) = \text{Ht} \times 10/\text{RBC}$$

$$\text{Hemoglobina corpuscular média (HCM; } \mu\text{g}) = [\text{Hb}] \times 10/\text{RBC}$$

$$\text{Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM; \%)} = [\text{Hb}] \times 100/\text{Ht}$$

2.4. Teste da velocidade crítica de natação (Ucrit).

Para a determinação da Ucrit foi utilizado um túnel de natação aberto, dotado de bombas com cabeçote de plástico, controladas por computadores. Os animais foram transferidos para o túnel por meio de manejo adequado, com

baixo nível de estresse, onde foram recuperados por duas horas a uma velocidade da água de 10 cm/s. A partir daí, a velocidade da água foi incrementada à razão de 10cm/s a cada 20 minutos, até a fadiga de todos os indivíduos. Os animais foram considerados fadigados quando permaneceram encostados na grade posterior do túnel, eletrificada com 24 volts AC. A Ucrit corresponde a última velocidade vencida inteiramente, corrigida pela fração relativa a última velocidade no momento da fadiga, como descrito por Brauner *et al.* (1993).

2.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). A significância estatística das diferenças entre as médias de cada tempo foi estimada por meio da análise de variância (ANOVA) de um fator, assumindo um nível de significância de 5%. Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para contraste entre as médias. No caso de violação das premissas para aplicação da ANOVA de um fator, foi utilizado uma ANOVA em ranks e o teste de Student-Newman-Keuls para contraste entre as médias (Zar, 1998).

3. Resultados

3.1 Hipoxia

Os dados hematológicos de hematócrito, RBC, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM não mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os animais submetidos a hipoxia e os animais do grupo controle. Também não foram verificadas diferenças entre os animais dos grupos controle fadigado e hipoxia fadigado. No entanto, observou-se que o exercício físico altera significativamente ($P < 0,05$) o estado fisiológico dos animais, em relação aos grupos que não nadaram (figuras 1A e B, 2A e B, 3A e B).

As análises do plasma mostram que a glicose e o cortisol não se elevaram nos peixes expostos a hipoxia, mas o exercício físico praticado pelos peixes elevou ($P < 0,05$) os níveis de cortisol para além dos níveis do grupo controle, enquanto que a glicose esteve elevada ($P < 0,05$) apenas no grupo controle fadigado (figura 4A e 5A). A exposição a hipoxia causou elevação ($P < 0,05$) dos níveis de lactato plasmático dos tambaquis a partir de 24 horas, mesmo instante no qual os animais submetidos a hipoxia passam a nadar menos ($P < 0,05$) que o grupo controle (figuras 4B e 6B). Em 96 horas de exposição os níveis de lactato do grupo sob hipoxia voltam a serem iguais aos do controle, permanecendo assim no *recovery*. O exercício físico também elevou ($P < 0,05$) os níveis de lactato dos tambaquis, porém sem efeito aditivo de uma exposição anterior a hipoxia.

A análise da concentração plasmática de sódio não revelou alterações causadas pela exposição a hipoxia, mas revelou que apenas o grupo controle

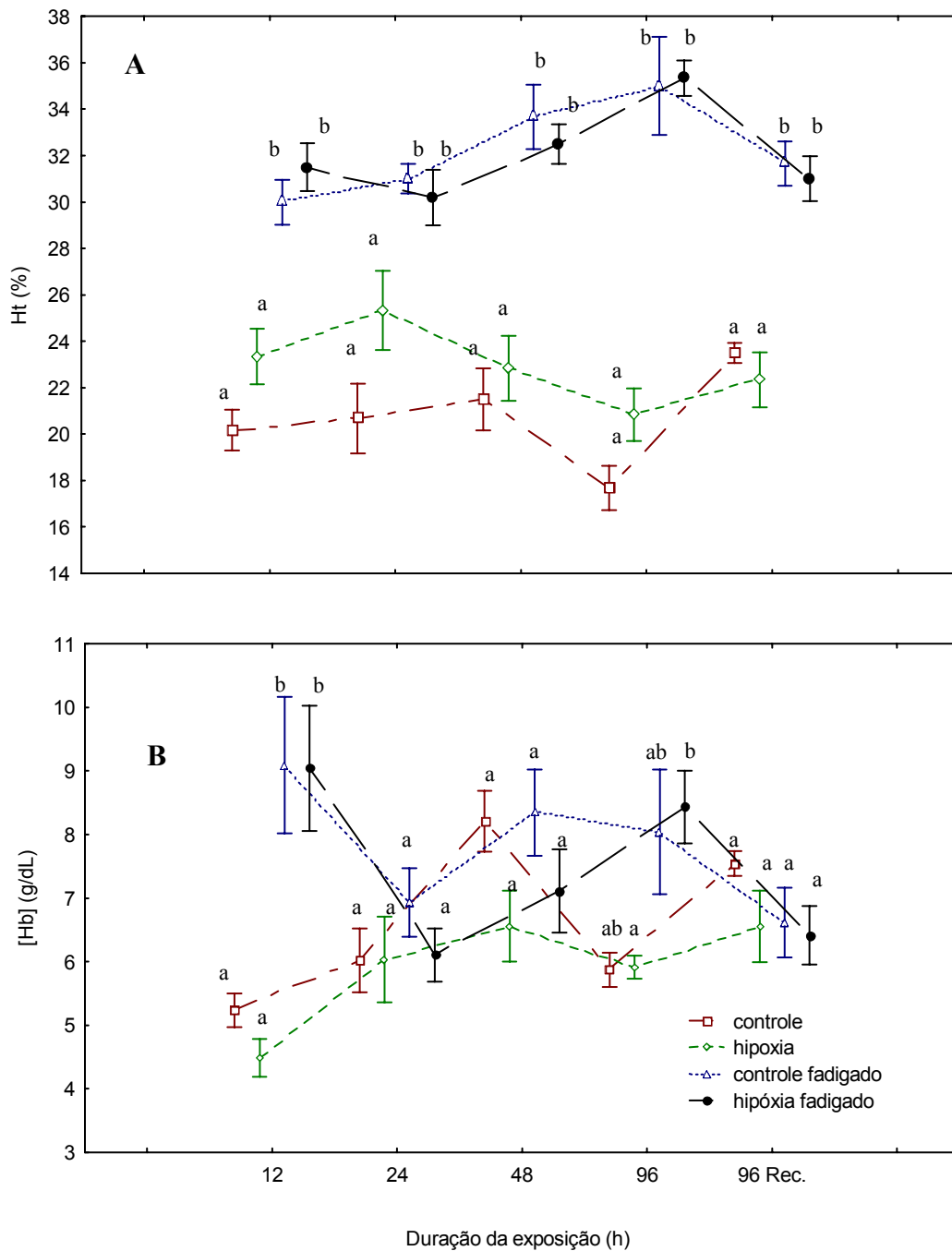


Figura 1. Porcentagem de hematócrito (A) e concentração de hemoglobina (B) de tambaquis expostos a hipoxia ($\pm 0,5\text{mg/L}$) por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

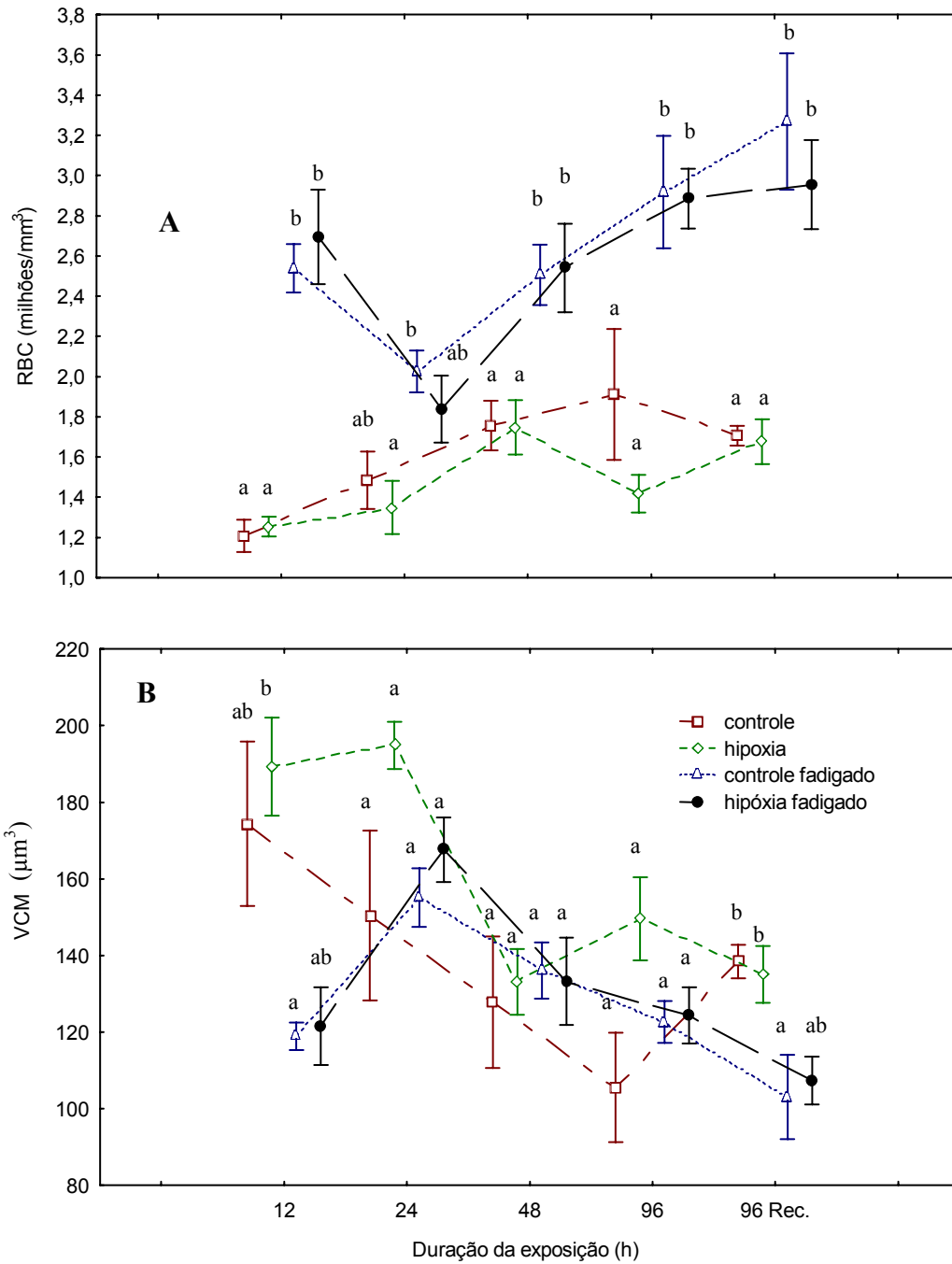


Figura 2. Contagem de células vermelhas (RBC) (A) e volume corpuscular médio (B) de tambaquis expostos a hipoxia ($\pm 0,5\text{mg/L}$) por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n=6$). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P<0,05$).

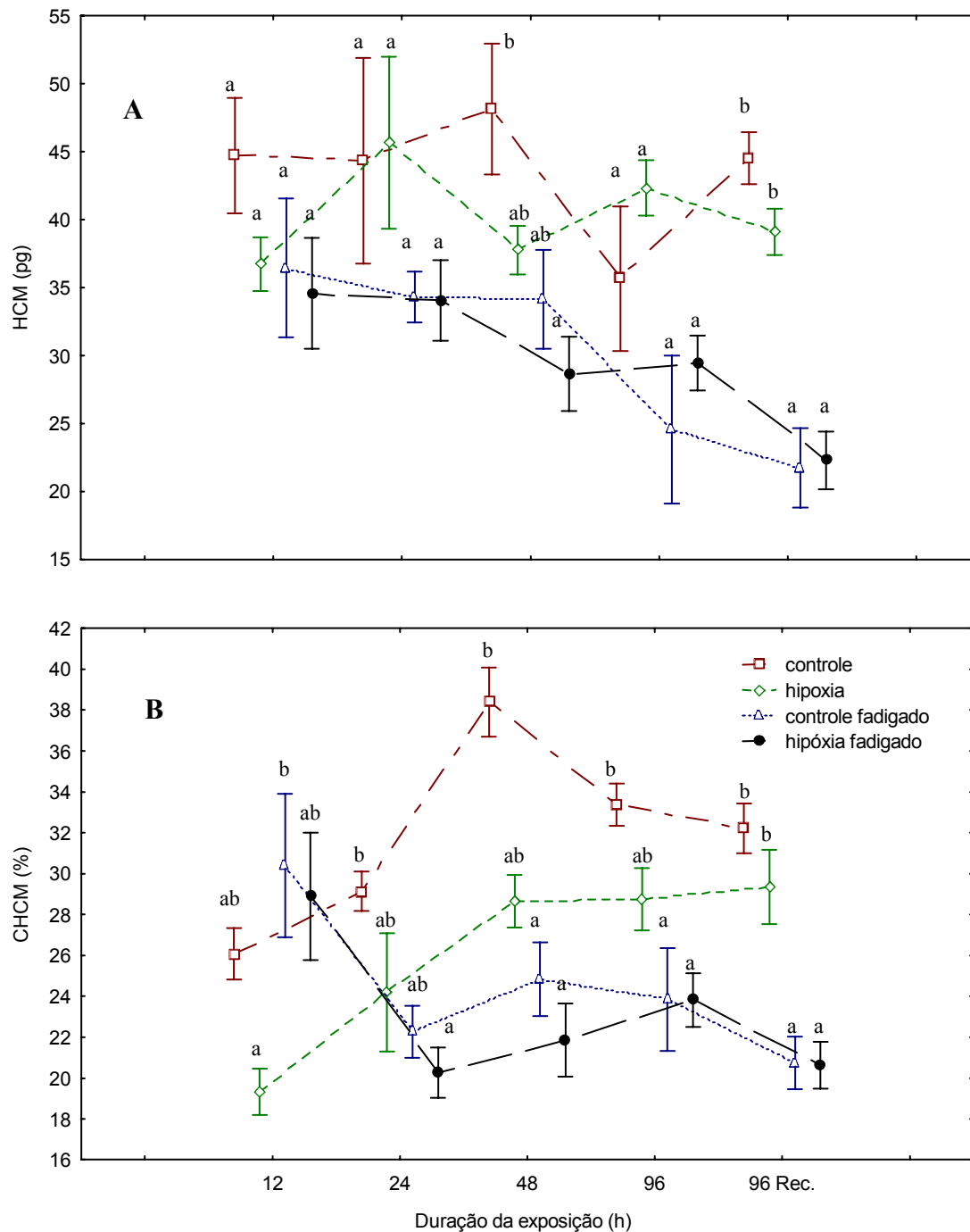


Figura 3. Hemoglobina corpuscular média (A) e concentração de hemoglobina corpuscular média (B) de tabaquis expostos a hipoxia ($\pm 0,5\text{mg/L}$) por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

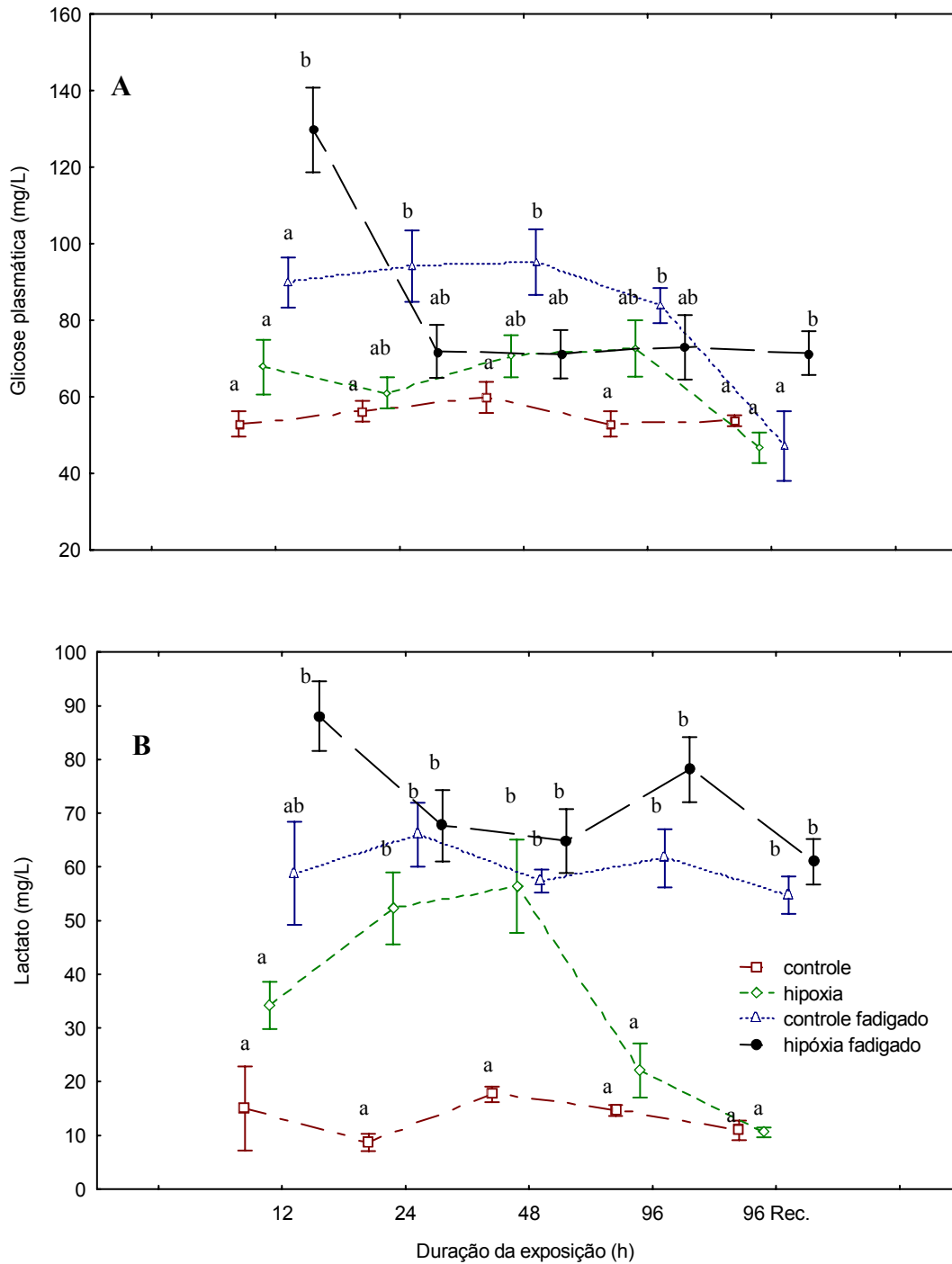


Figura 4. Glicose plasmática (A) e lactato plasmático (B) de tambaquis expostos a hipoxia (\pm 0,5mg/L) por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

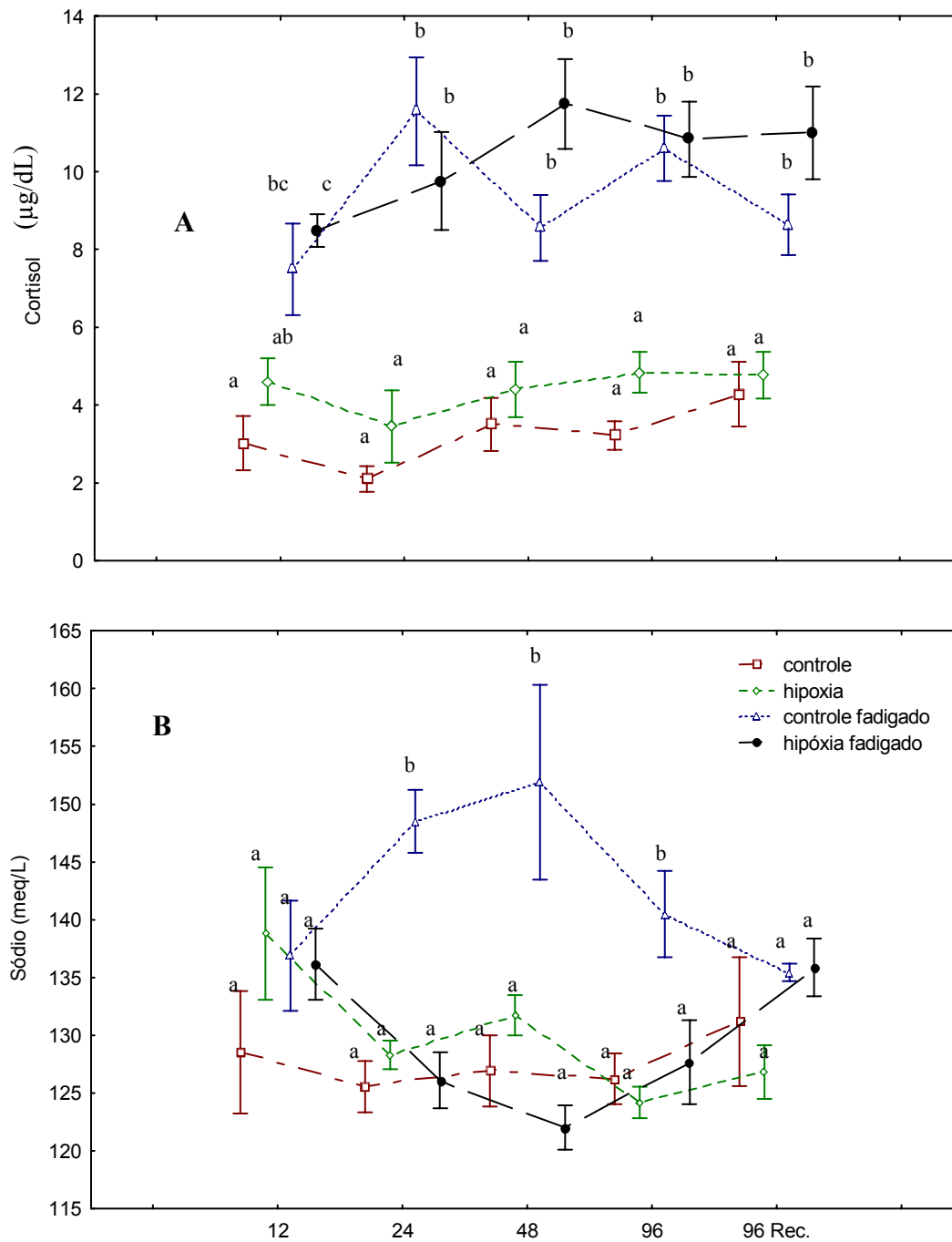


Figura 5. Cortisol (A) e sódio plasmático (B) de tabaquis expostos a hipoxia ($\pm 0,5\text{mg/L}$) por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n=6$). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

fadigado apresentou um aumento ($P < 0,05$) dos níveis desse íon, quando comparados ao controle (figura 5B). Em contraste com o sódio, além de haver aumento ($P < 0,05$) da concentração de potássio no plasma dos animais submetidos a hipoxia, há também aumento ($P < 0,05$) da concentração desse íon em ambos os grupos submetidos ao túnel de natação (figura 6A).

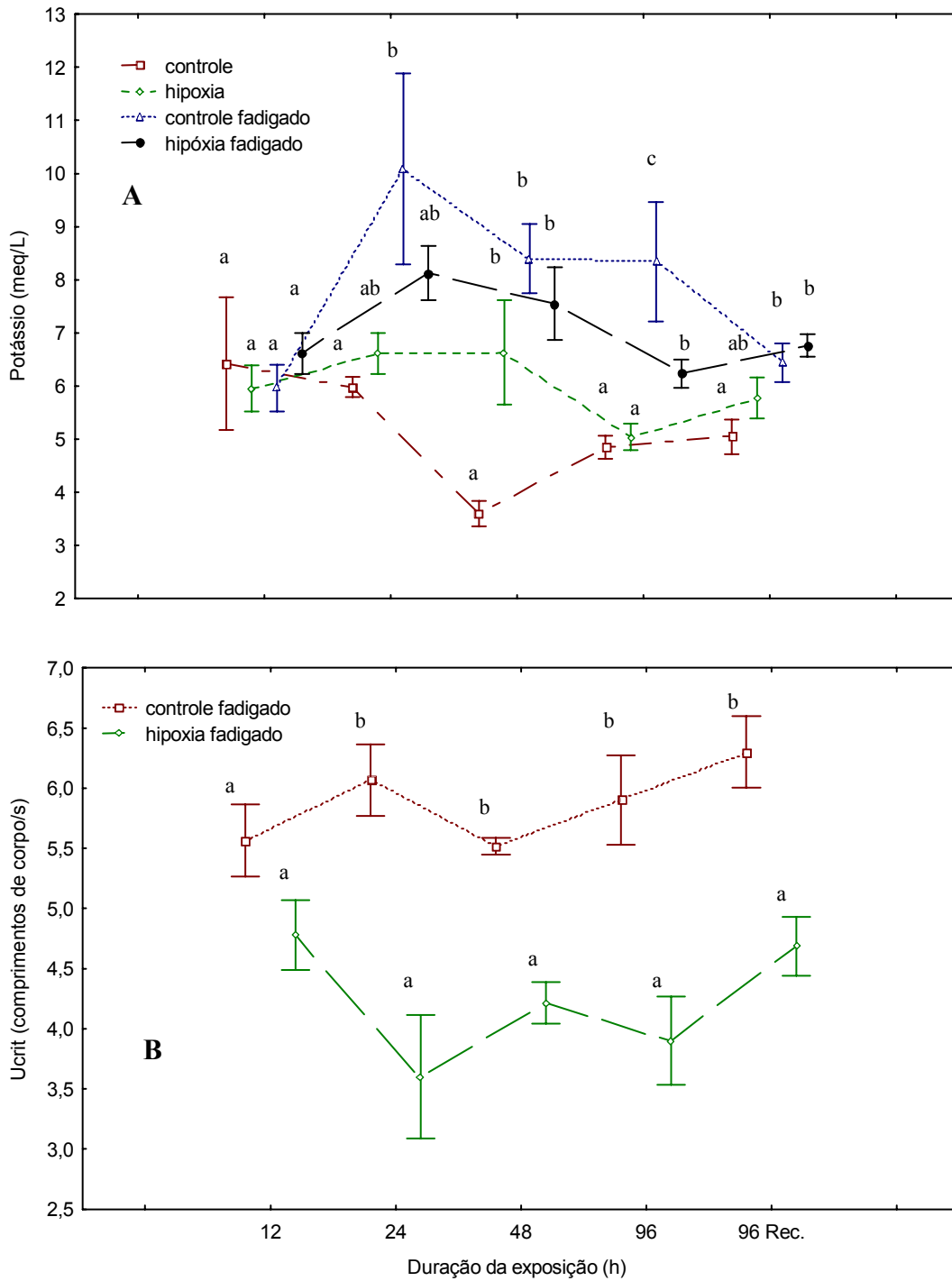


Figura 6. Potássio (A) e velocidade crítica de natação (B) de tambaquis expostos a hipoxia ($\pm 0,5\text{mg/L}$) por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n=6$). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P<0,05$).

3.2 pH

As análises hematológicas mostraram que o hematócrito, hemoglobina e RBC foram significativamente alterados ($P < 0,05$) pela exposição ao pH ácido. O exercício físico também foi capaz de elevar ($P < 0,05$) os níveis desses parâmetros para além dos níveis do grupo controle, porém sem efeito aditivo de uma exposição anterior a pH ácido (figuras 7A e B e 8A). O volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferenças entre os grupos; no entanto, a concentração de hemoglobina corpuscular média diminuiu ($P < 0,05$) nos grupos exercitados, quando comparados ao controle (figuras 8B, 9A e B).

As análises plasmáticas revelaram que o pH ácido foi capaz de elevar ($P < 0,05$) os níveis de glicose e de cortisol dos peixes, quando comparados ao grupo controle (figuras 10A e 11A). O exercício físico eleva ($P < 0,05$) ainda mais os níveis desses dois parâmetros nos tambaquis, porém, apenas a glicose apresentou um efeito aditivo ($P < 0,05$) entre a exposição ao pH ácido e o exercício físico. Em contraste com a glicose, os tambaquis submetidos ao pH ácido não apresentaram elevação dos níveis de lactato, mas o teste de Ucrit foi capaz de elevar ($P < 0,05$) os níveis desse metabólito para além dos níveis do grupo controle, em ambos os grupos fadigados (figura 10B). As análises dos íons mostram que o pH ácido causou diminuição ($P < 0,05$) da concentração de sódio no plasma, enquanto que o exercício físico aumentou ($P < 0,05$) os níveis desse íon apenas no grupo controle fadigado (figura 11B). O potássio apresenta-se elevado ($P < 0,05$) em ambos os grupos fadigados, quando comparados ao controle, mas não é afetado pela exposição ao pH baixo (12A).

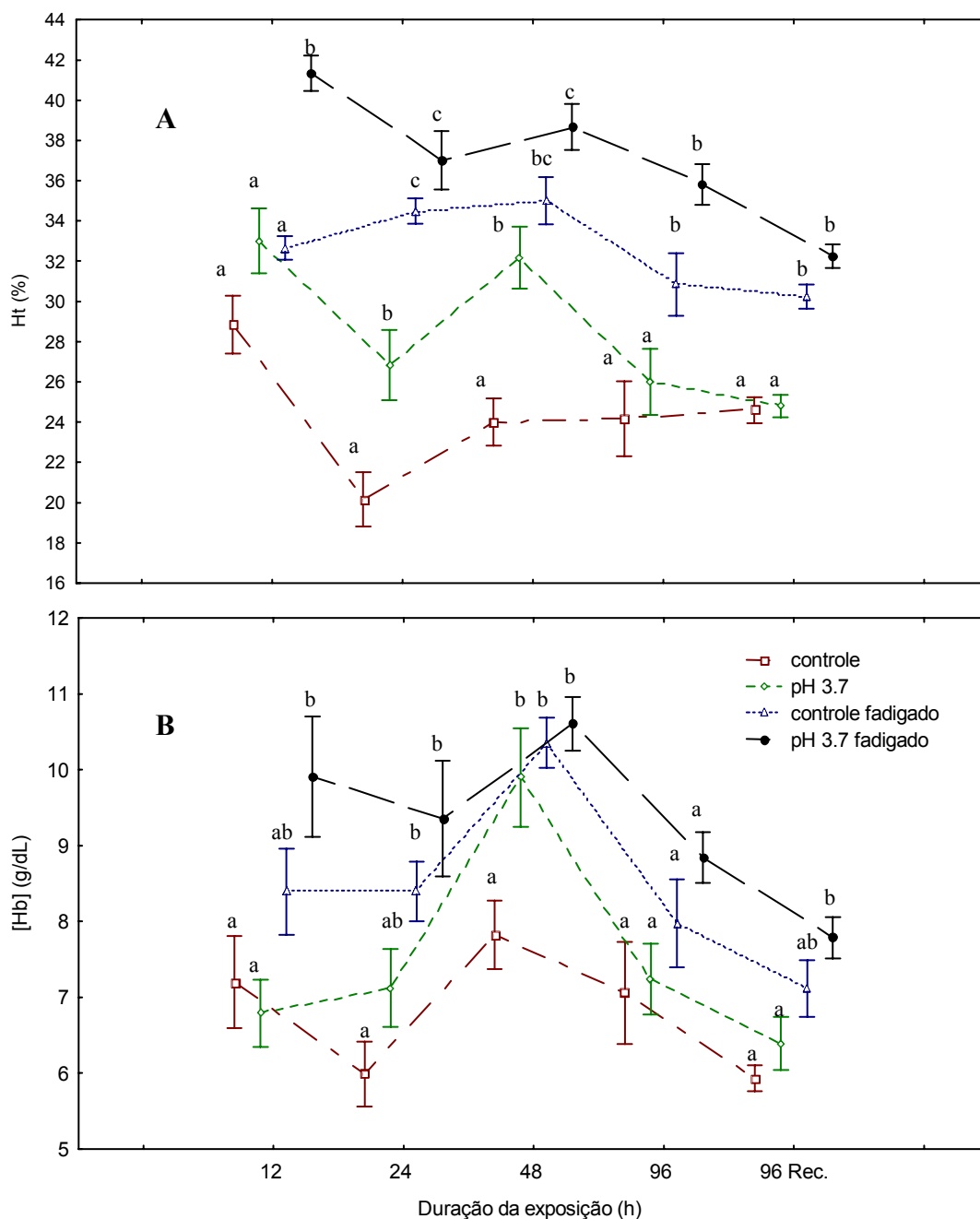


Figura 7. Hematócrito (A) e concentração de hemoglobina (B) de tambaquis expostos a pH 3.7 por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

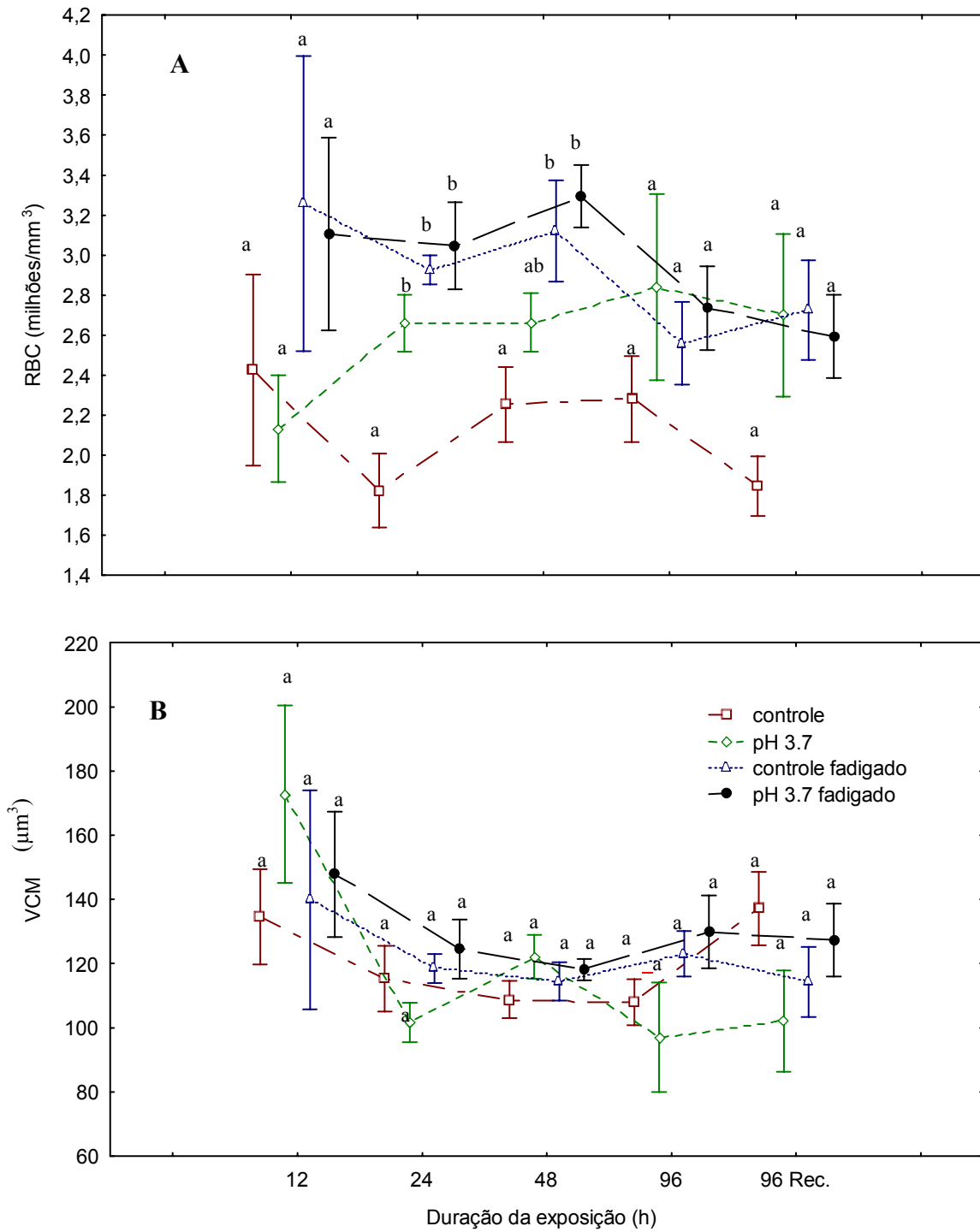


Figura 8. Contagem de células vermelhas (A) e volume corpuscular médio (B) de tabaquis expostos a pH 3.7 por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

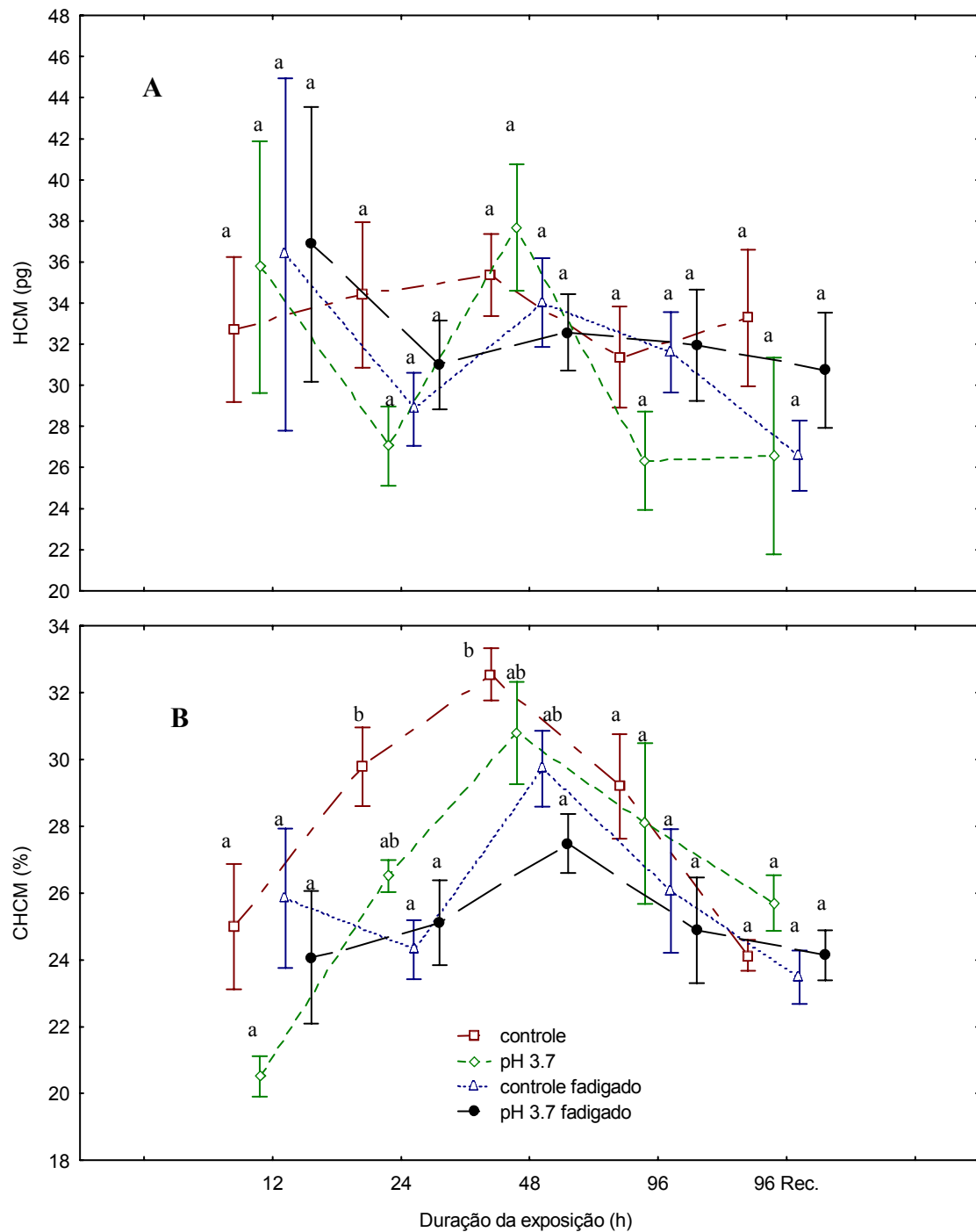


Figura 9. Hemoglobina corpuscular média (A) e concentração de hemoglobina corpuscular média (B) de tabaquis expostos a pH 3.7 por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

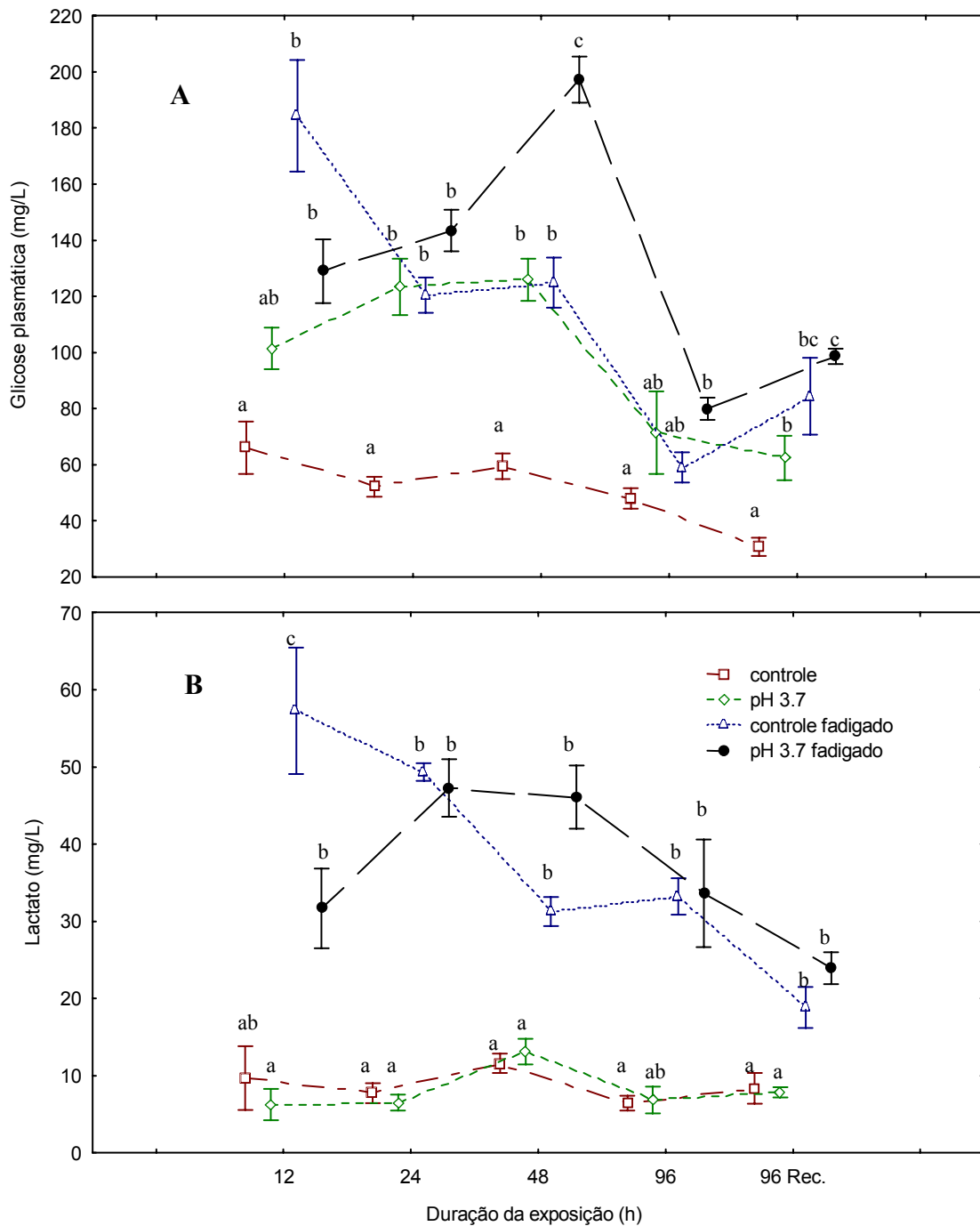


Figura 10. Glicose (A) e lactato plasmático (B) de tambaquis expostos a pH 3.7 por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

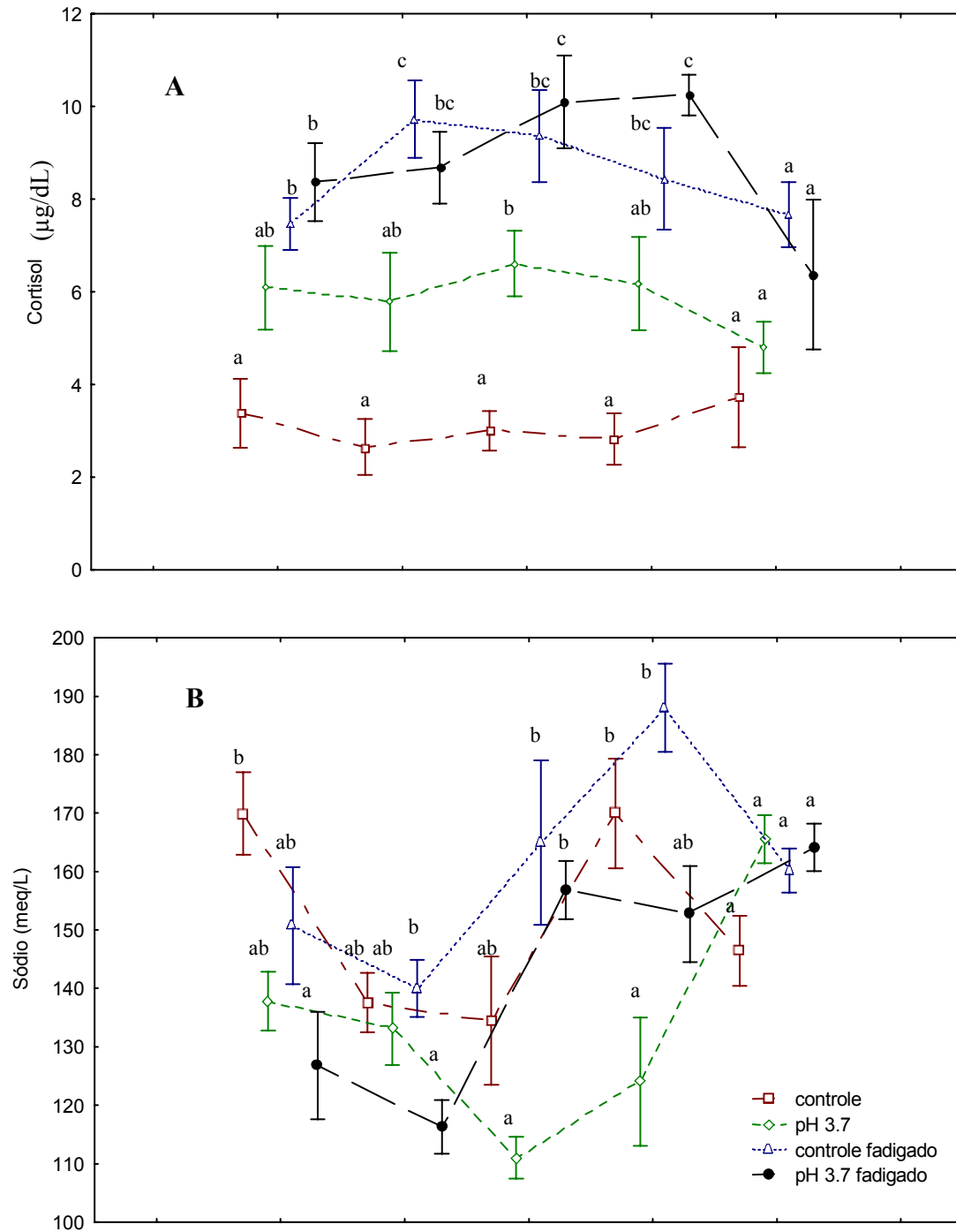


Figura 11. Cortisol (A) e sódio plasmático (B) de tabaquis expostos a pH 3.7 por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n=6$). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

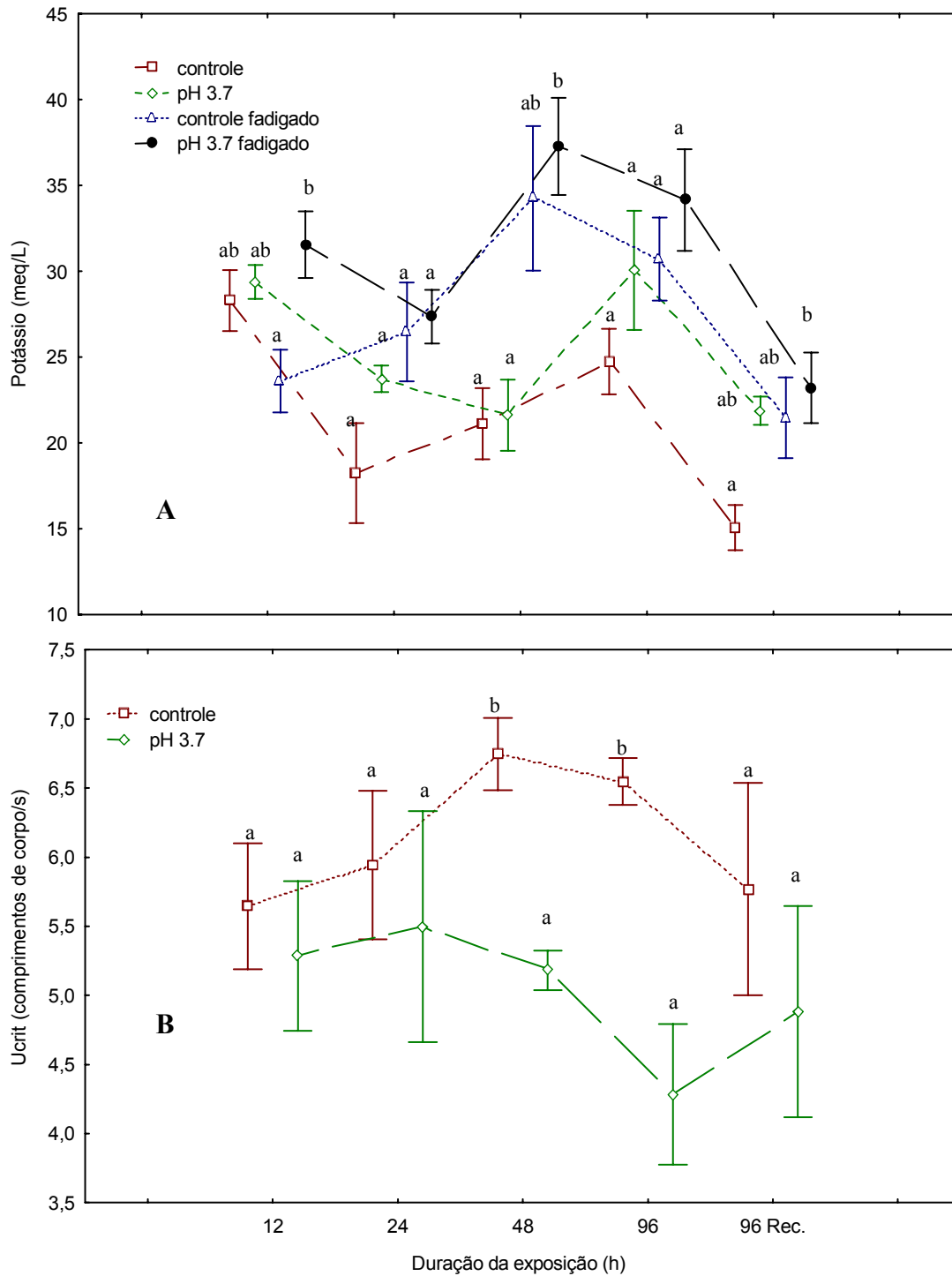


Figura 12. Potássio plasmático (A) e velocidade crítica de natação (Ucrit); (B) de tambaquis expostos a pH 3.7 por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

3.3 Amônia

As análises do sangue revelam que os valores de hematócrito, hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média foram significativamente alterados ($P < 0,05$) pela exposição a amônia. O exercício físico também foi capaz de alterar ($P < 0,05$) esses parâmetros para níveis diferentes do controle (figuras 13A e B e 15B). O RBC, o volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média não apresentaram alterações significativas entre os grupos (figura 14A e B e 15A).

Em relação aos constituintes plasmáticos, a glicose e o cortisol mostraram-se sensíveis ($P < 0,05$) à exposição a amônia, mas retornam aos níveis iguais aos do controle no *recovery* (figuras 16A e 17A). O exercício físico eleva ($P < 0,05$) ainda mais os níveis desses parâmetros nos tambaquis, porém, sem efeito aditivo de um estresse anterior. Ao contrário do ocorrido com a glicose e com o cortisol, a exposição a amônia não causou elevação dos níveis plasmáticos de lactato, mas o exercício físico elevou ($P < 0,05$) os níveis desse metabólito para além dos níveis do grupo controle, exceto no grupo sob amônia fadigado em 96 horas, justamente quando esse grupo passa a nadar menos ($P < 0,05$) que o controle fadigado (figuras 16B e 18B). O potássio não foi significativamente afetado pela amônia ou pelo exercício físico, enquanto que o sódio teve sua concentração diminuída ($P < 0,05$) nos animais expostos a amônia, e aumentada ($P < 0,05$) nos animais do grupo controle fadigado, quando comparadas ao grupo controle (figuras 18A e 17B).

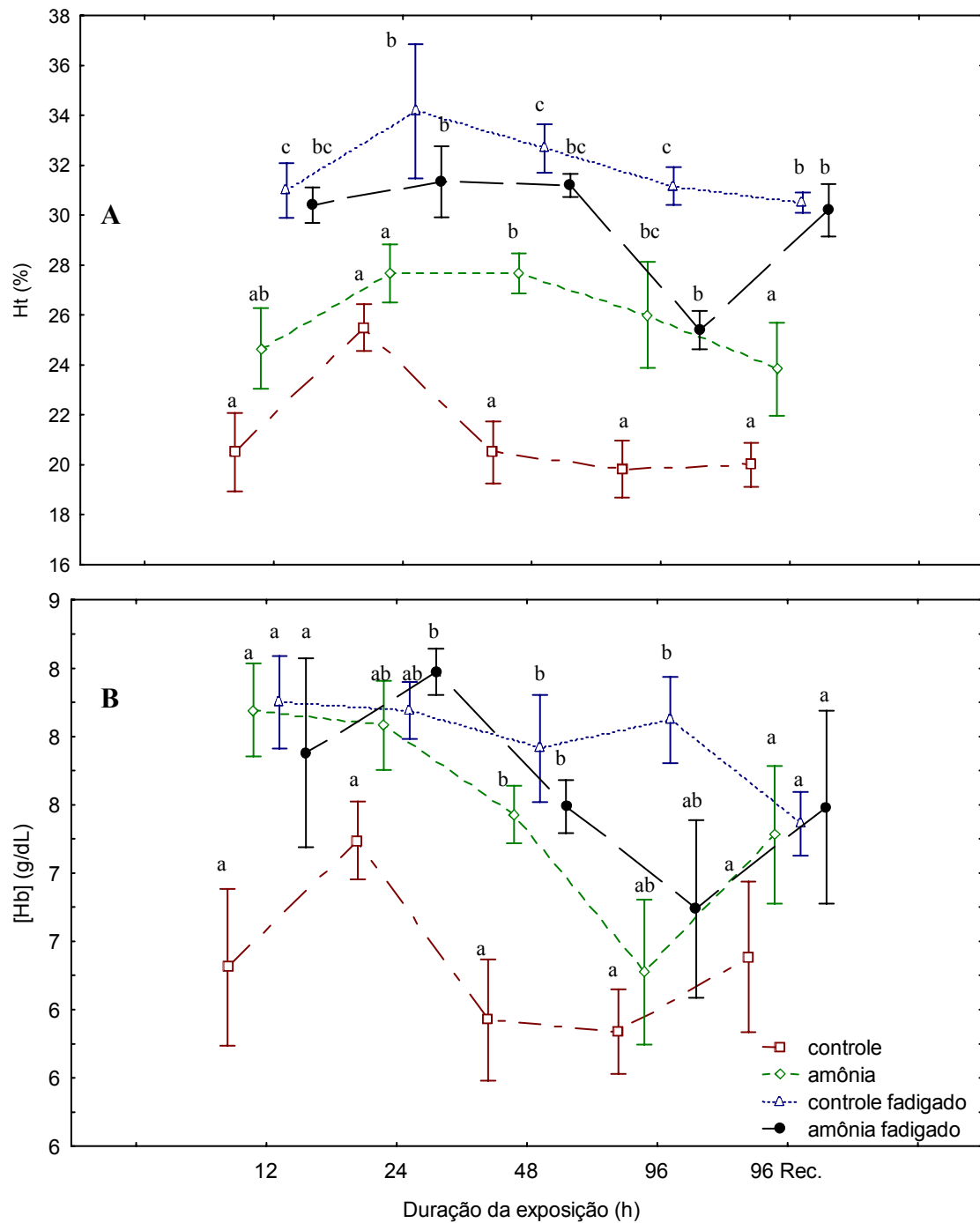


Figura 13. Hematócrito (A) e concentração de hemoglobina (B) de tambaquis expostos a 0,3 mg/L de amônia gasosa por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

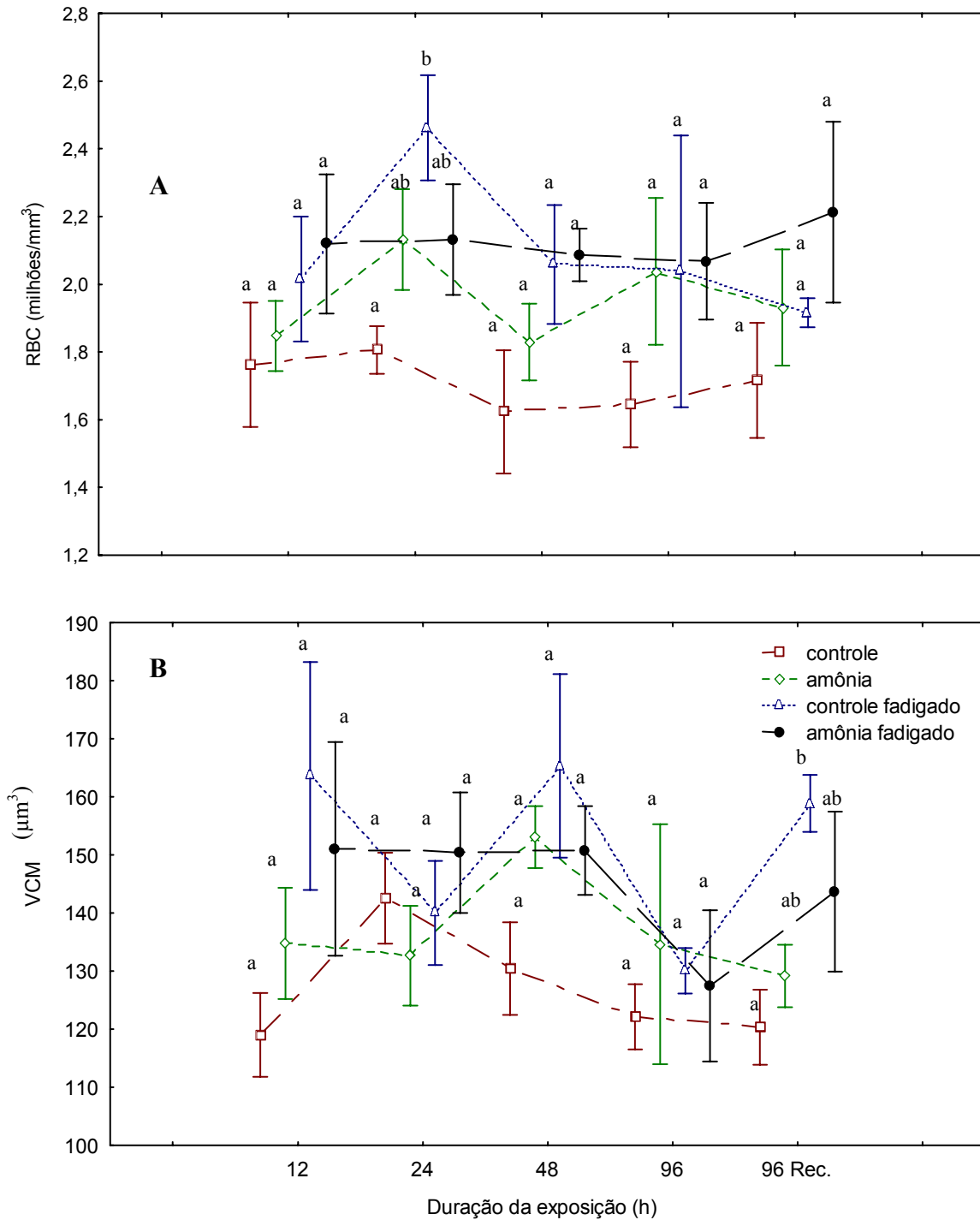


Figura 14. Contagem de células vermelhas (A) e volume corpuscular médio (B) de tambaquis expostos a 0,3 mg/L de amônia gasosa por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

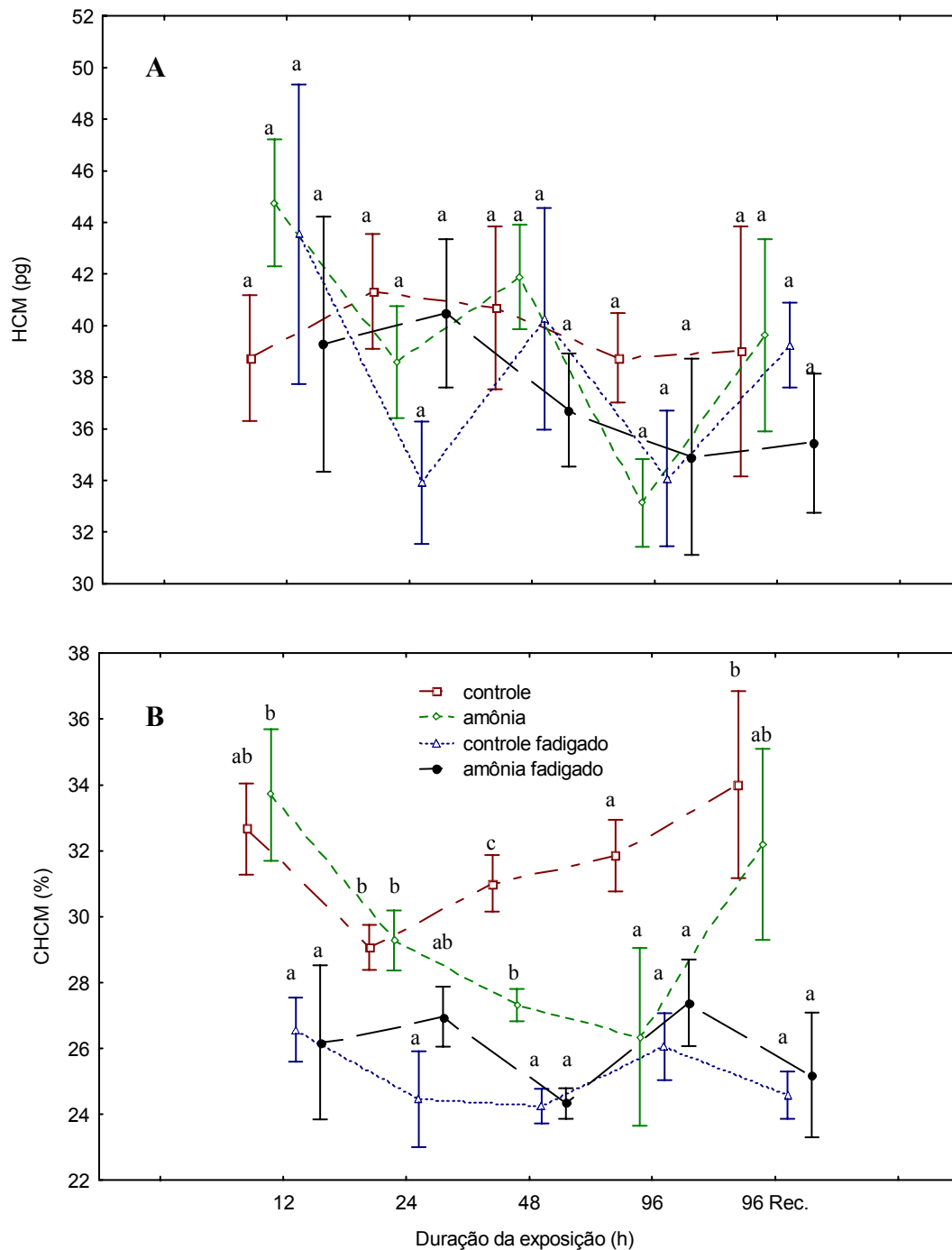


Figura 15. Hemoglobina corpuscular média (A) e concentração de hemoglobina corpuscular média (B) de tabaquistas expostos a 0,3 mg/L de amônia gasosa por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

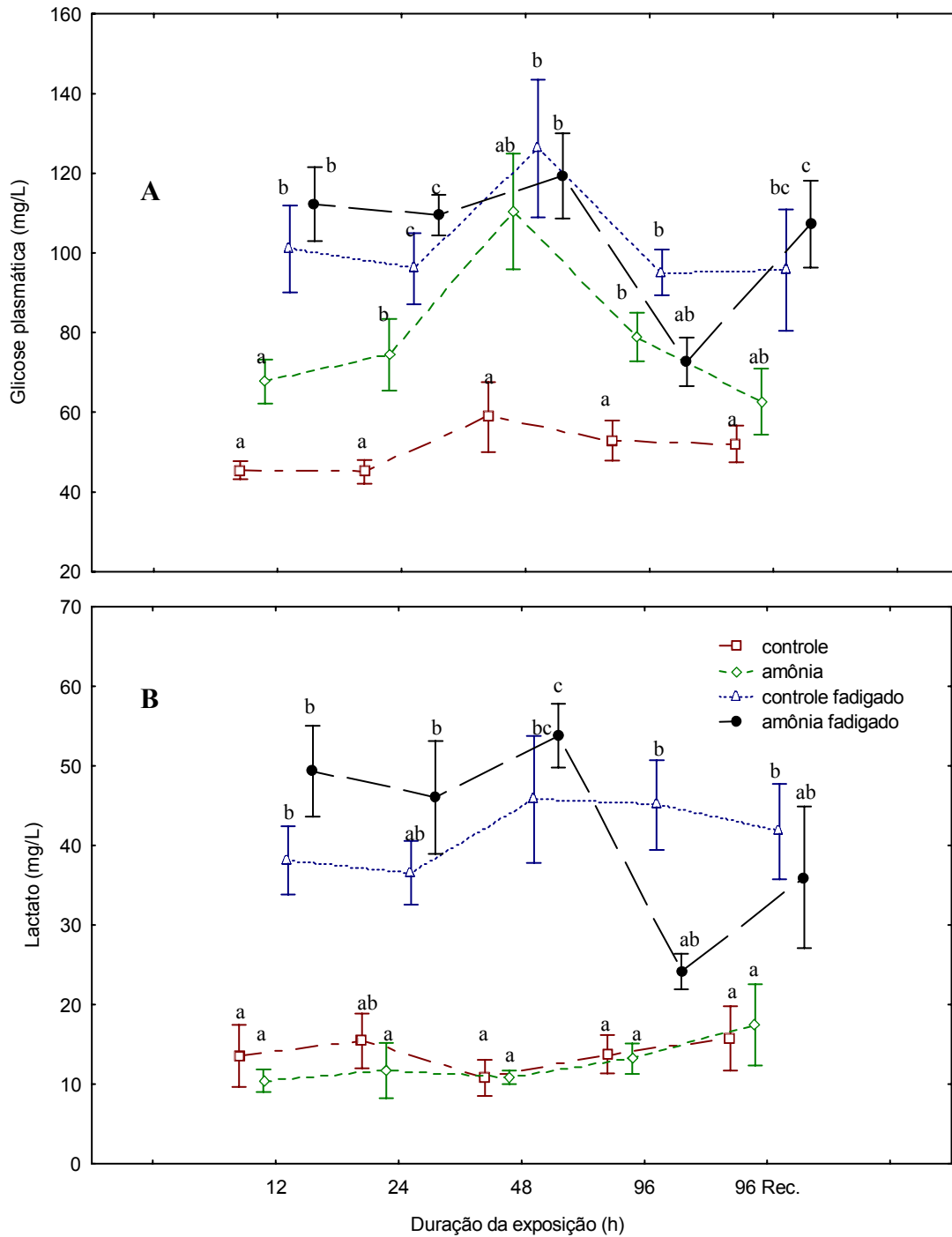


Figura 16. Concentração de glicose (A) e lactato (B) plasmático de tabaquis expostos a 0,3 mg/L de amônia gasosa por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

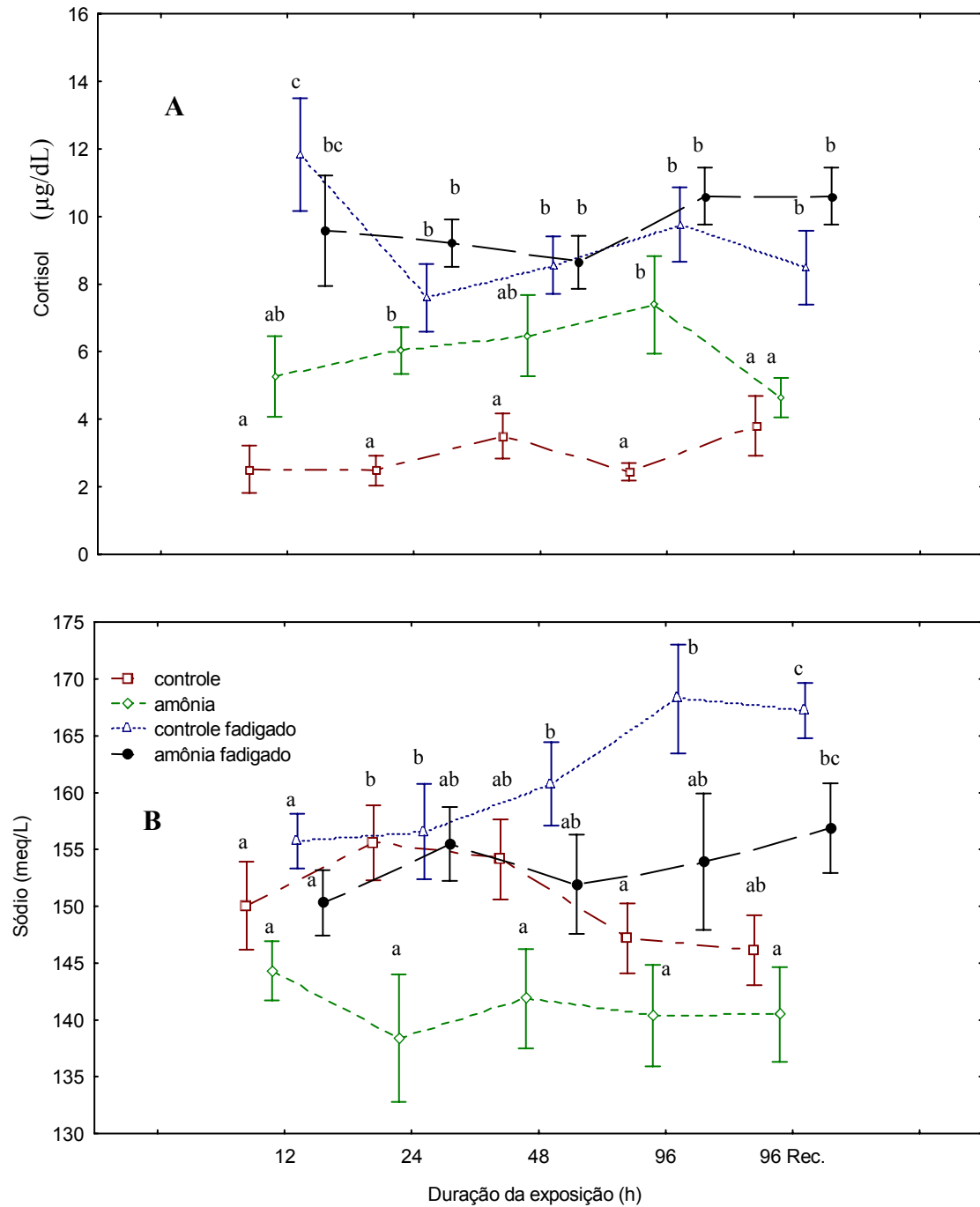


Figura 17. Cortisol (A) e sódio (B) plasmático de tabaquis expostos a 0,3 mg/L de amônia gasosa por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

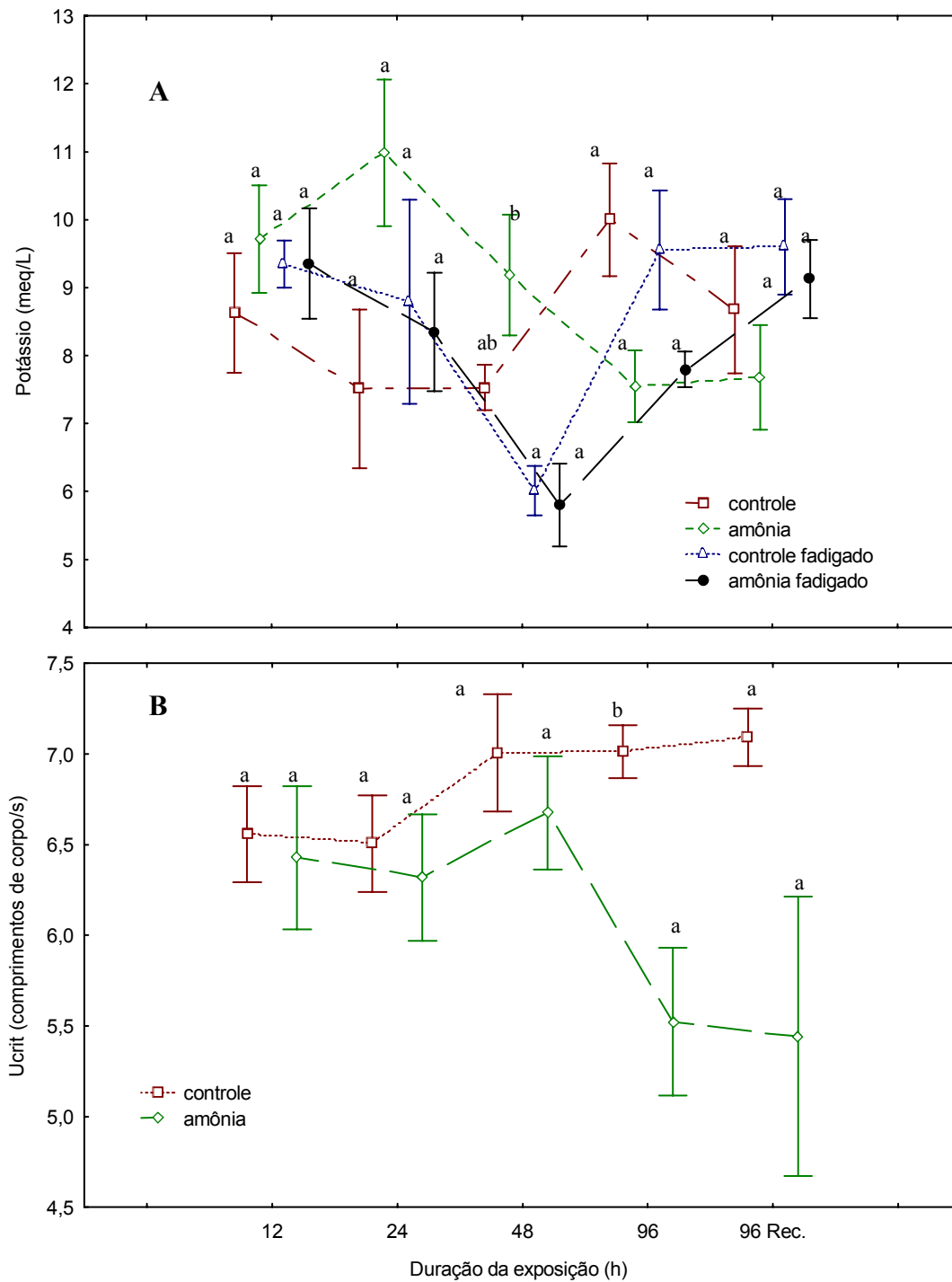


Figura 18. Potássio (A) e velocidade crítica de natação (Ucrit); (B) de tambaquis expostos a 0,3 mg/L de amônia gasosa por 12h, 24h, 48h, 96h e 96h+96h *recovery* e submetidos ao teste de Ucrit até a fadiga. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=6). O contraste entre as médias foi feito apenas dentro de um mesmo período de tempo, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,05$).

3.4 Agrupamento dos dados obtidos

Reunindo-se em um único gráfico (média e desvio padrão da média) todos os grupos, independente do tratamento, que apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) de Ucrit (24,48,96 e 96R), vemos que os animais expostos a condições potencialmente estressantes apresentam uma velocidade crítica de natação menor ($P < 0,01$; t-test; figura 19).

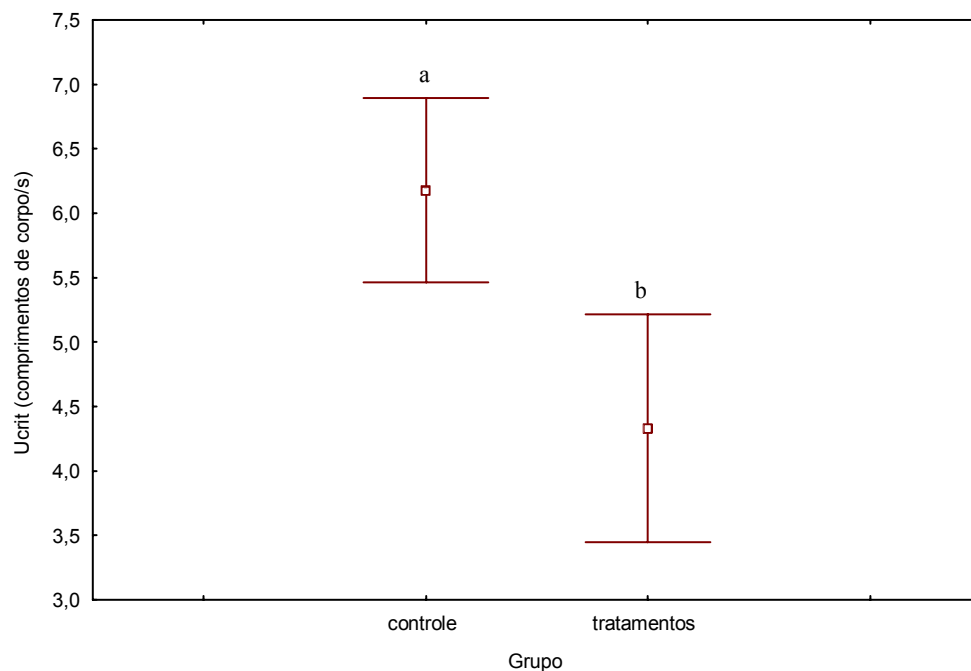


Figura 19. Agrupamento dos tratamentos hipoxia, pH e amônia fadigados, que apresentaram diferença estatística em relação ao controle, independente do período de exposição, sendo que pontos com letras diferentes denotam diferença significativa ($P < 0,01$; t-teste).

4. Discussão

4.1 Hipoxia

Embora não tenha ocorrido aumento do cortisol nos tambaquís submetidos a hipoxia, os grupos submetidos ao túnel de natação tiveram os níveis desse hormônio maiores ($P < 0,05$) do que os demais grupos (figura 5A). A função do cortisol parece estar ligada a mobilização de glicogênio do fígado, aminoácidos, glicerol ou até mesmo lactato para a produção de glicose, permitindo uma fonte contínua de substrato para a oxidação muscular (De Boeck *et al.*, 2001; Vijayan *et al.*, 1997). O cortisol tem sido sugerido também como o principal responsável pela recuperação dos peixes após o exercício, participando da eliminação do lactato e resíntese de glicogênio (Kieffer, 2000). Assim como o cortisol, a glicose também não apresentou aumento na sua concentração ao longo de 96 horas de exposição a hipoxia (figura 4A). Araújo-Porto (2005) também não verificou aumento da glicose em tambaquís expostos a 12 horas de hipoxia.

Os valores de hematócrito, hemoglobina, RBC, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média não foram alterados pela exposição a hipoxia, em nenhum período de tempo (figuras 1A e B, 2A e B e 3B). No entanto, devido o aumento da concentração de lactato nos animais expostos a hipoxia por 24 e 48 horas (figura 4B), seria esperado um aumento do volume corpuscular médio, assim como verificado por Moura (1994), também expondo tambaquís a hipoxia. É conhecido que o lactato acumulado no plasma estimula o ciclo de Jacob-Stewart (Lessard *et al.*, 1995; Perry *et al.*, 1999), que ativa a troca de prótons

intraeritrocitários por sódio plasmático, permitindo um pH adequado para a ligação da hemoglobina com o oxigênio. No entanto, a entrada de sódio causaria inchaço celular (Nikinmaa, 2001), já que com a entrada do íon há, também, a entrada de água. Em 12h de hipoxia, os níveis de lactato acumulados ainda foram baixos (figura 4B), provavelmente, o que permitiu uma Ucrit satisfatória (figura 6B). O desempenho natatório começa a ser prejudicado a partir de 24 horas, quando os níveis de lactato se elevam e impedem o animal de utilizar-se da natação anaeróbica. Embora se acredite que durante o teste de Ucrit o animal se utilize na maior parte da natação aeróbica (Hammer, 1995; Burgetz *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2003; Peak & Farrel, 2004), o acúmulo de lactato parece ter impedido o animal de continuar nadando. É importante observar que os peixes do grupo controle fadigaram sem atingir níveis de lactato tão altos quanto os níveis do grupo hipoxia fadigado, mas é provável que nas velocidades mais altas do túnel (± 70 cm/s), a utilização da natação explosiva (anaeróbica) seja pouco eficaz, visto que é necessário algum tempo de recuperação entre uma explosão muscular e outra (Webb, 1998), fazendo com que o peixe seja arrastado pela corrente de água, mesmo que ainda não tenha atingido completa fadiga dos músculos brancos.

Foi verificado aumento da concentração de sódio plasmático nos animais do grupo controle fadigado, os quais apresentaram maior Ucrit (figuras 5B e 6B). O aumento da concentração desse íon também foi verificado em trutas arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) após exercício exaustivo (Wang *et al.*, 1994) e os autores sugeriram que tal fenômeno foi causado pelo movimento de fluídos para outras estruturas do corpo, que não os músculos brancos, ou até mesmo a

captura de sódio da água, em troca por H^+ . No presente estudo sugere-se que os animais do grupo controle fadigado aumentaram o número de eritrócitos (RBC) circulantes e hematócrito devido, principalmente, a hemoconcentração causada pelo esforço físico, com provável influxo de água do plasma para os tecidos ou para o meio externo. Ao contrário da proposta de Wang e colaboradores (1994), a captura de sódio pelas brânquias devido o excesso de H^+ no plasma não parece ter ocorrido no presente estudo, já que o grupo sob hipoxia fadigado atingiu os níveis mais elevados de lactato sem elevar os níveis de sódio plasmático (figuras 4B e 5B). O grupo sob hipoxia fadigado não poderia ter o número de eritrócitos e hematócrito aumentados devido ao esforço físico, já que não nadaram tanto quanto o outro grupo. No entanto, os níveis altos de lactato poderiam ter causado o aumento do hematócrito e do volume corpuscular médio, pelo efeito desencadeador da troca entre prótons intraeritrocitários e sódio plasmático, o que causaria o influxo de água do plasma para as células, causando assim hemoconcentração. Os dados acerca dos níveis de potássio (figura 6A) mostram que ambos os grupos submetidos ao túnel de natação tiveram os níveis desse íon aumentados, sendo que no grupo controle fadigado os níveis foram ainda maiores ($P < 0,05$), reforçando a teoria da movimentação de fluídos, causada pelo exercício físico, proposta por Wang e colaboradores (1994).

Após aproximadamente 48h, ajustes em isoenzimas da lactato desidrogenase ocorreram nos tambaquis (Almeida-Val *et al.*, 1993; Val, 1995, 1996; Val *et al.*, 1998), melhorando sua capacidade em utilizar o lactato como combustível aeróbico nos músculos vermelhos (Moyes & West, 1995) e,

conseqüentemente, impedindo seu acúmulo (figura 4B). É importante observar, no entanto, que essa diminuição não restabelece o desempenho natatório dos peixes, provavelmente porque os ajustes metabólicos que facilitam o uso do lactato, prejudicam o uso do glicogênio, que é mais eficiente durante o exercício aeróbico (Moyes & West, 1995). Os dados de Ucrit (figura 6B) mostram que o período de *recovery* não foi suficiente para que os tambaquis do grupo exposto a hipoxia retornassem ao estado de equilíbrio metabólico original, impedindo que nadassem tanto quanto o grupo controle.

4.2 pH

Butler & Day (1993), em um estudo com truta marrom (*Salmo trutta*) exposta a pH ácido, verificaram significativa perda de íons do plasma, causando perda de água por osmose e culminando no aumento da viscosidade do sangue. Segundo eles, a dificuldade do coração em bombear tal sangue pode ter diminuído a velocidade crítica de natação dos peixes. No presente estudo, foi verificada perda de sódio do plasma em 96 horas (figura 11B), provavelmente devido ao bloqueio que o pH ácido causa na troca entre sódio externo por prótons internos (Wilson *et al.*, 2000; Lin & Randall, 1993). Na falta da captura ativa desse íon, seus níveis plasmáticos diminuiriam, já que podem ser também perdidos pela urina (Bone *et al.*, 1995). É provável que a perda de sódio cause, por osmose, a perda de água, o que poderia explicar o aumento do hematócrito (figura 7A), da hemoglobina (figura 7B) e do RBC (figura 8A) dos grupos sob pH ácido, em relação ao controle. O volume corpuscular médio (VCM) não apresentou diferença entre esses mesmos grupos (figura 8B), mostrando que a

falta de sódio plasmático pode impedir o inchaço eritrocitário, já que depende da entrada desse íon para a extrusão de H^+ interno (Lessard *et al.*, 1995; Perry *et al.*, 1999). Acredita-se que o inchaço celular seja estimulado pela ação das catecolaminas, liberadas durante estresse (Nikinmma, 2001). As figuras 10A e 11A (glicose e cortisol, respectivamente) mostram que os tratamentos foram suficientemente estressantes para que o inchaço celular ocorresse, embora isso não tenha ocorrido. Wood e colaboradores (1998) mostraram que a exposição de tabaquis a pH 3 causou perda de sódio, acompanhada de elevação da concentração de amônia plasmática. Tem sido proposto que a amônia seja eliminada com a ajuda de um sistema de troca por sódio externo (Salama *et al.*, 1999; Kelly & Wood, 2001), o qual poderia ser prejudicado pela competição do H^+ pelos sítios de ligação. Adicionalmente, o excesso de H^+ interno pode ligar-se à amônia gasosa, formando NH_4^+ (Karnaky, 1998) que poderia se acumular no plasma do peixe. A figura 10B mostra que apesar das alterações causadas pelo pH ácido, o sistema aeróbico permanece suprindo as necessidades celulares mínimas, visto que o lactato não se elevou em nenhum momento. A concentração de potássio (figura 12A) não parece ser alterada pelo pH ácido, mas há elevação da sua concentração nos animais que foram submetidos ao túnel de natação e, como já mencionado no experimento de hipoxia, o exercício físico pode causar a movimentação ou a perda de fluídos, concentrando o sangue. Os dados de hemoglobina e RBC (figuras 7B e 8A) mostraram também que o exercício físico causa hemoconcentração. Quanto à concentração de sódio, o grupo sob pH ácido fadigado apresentou valores menores ($P < 0,05$) que o do grupo controle fadigado, mostrando que mesmo a hemoconcentração não é

capaz de restabelecer os níveis normais desse íon (figura 5B). A Ucrit (figura 12B) de tambaquis mostrou-se sensível a pH 3.7 a partir de 48 horas de exposição. O hematócrito (figura 7A) do grupo sob pH ácido fadigado apresentou os maiores ($P < 0,05$) valores em 12 horas sob hipoxia, mostrando que pode haver um efeito cumulativo do pH com o exercício físico na hemoconcentração. O gráfico 10A mostra que pode haver um efeito cumulativo do estresse causado pela exposição ao pH ácido e do exercício físico sobre a glicose plasmática. No entanto, embora os animais acabem ficando mais estressados, o sistema anaeróbico parece continuar funcionando corretamente, já que os animais do grupo sob pH ácido, que tiveram a menor Ucrit, foram capazes de acumular a mesma quantidade de lactato nos músculos (figura 10B). Ocorre que, os animais expostos ao pH ácido iniciam o exercício físico com o sangue já concentrado, devido à perda de sódio. Isso poderia fazer com que os animais perdessem a capacidade aeróbica mais cedo que o grupo controle, passando a utilizar mais do sistema anaeróbico, e fadigando logo que os níveis de lactato atinjam valores elevados. Conseqüentemente, o pH ácido pode diminuir o desempenho dos peixes pelo efeito da hemoconcentração, diminuindo como conseqüência, o vigor físico do peixe. Nesse caso, um período de 96 horas de recuperação parece ser suficiente para que o tambaqui se restabeleça.

4.3 Amônia

Beumont e colaboradores (1995) mostraram que a infusão de bicarbonato de amônia em truta marrom causou redução significativa na natação dos peixes e atribuíram isso ao efeito negativo da amônia na fosforilação oxidativa nos músculos brancos e no ciclo glicolítico dos músculos vermelhos. Recentes

trabalhos mostraram a interferência da amônia na polarização dos músculos, provavelmente com o NH_4^+ deslocando K^+ (Beumont *et al.*, 2000ab). No entanto, é provável que a amônia diminua o desempenho natatório dos peixes por múltiplos processos (Shingles *et al.*, 2001). O tratamento utilizado neste trabalho mostrou-se estressante a partir de 24 horas, visto que os níveis de glicose e cortisol aumentaram no grupo sob amônia, em relação ao controle. No *recovery* elas foram iguais (figuras 10A e 11A). Também pode ser observado pelos gráficos que o hematócrito e hemoglobina indicam hemoconcentração, causada pela exposição à amônia (figura 1 A e B). Altas concentrações de amônia gasosa na água impedem um perfeito gradiente para a extrusão da amônia plasmática. Assim, com efeito similar ao do pH baixo, o sódio tem sua concentração diminuída no plasma (figura 17B), já que este íon é capturado por bombas apicais, que trocam amônia interna por sódio externo (Salama *et al.*, 1999; Kelly & Wood, 2001). Apesar de ter alterado o sistema circulatório, com perda de sódio e hemoconcentração, a exposição à amônia não prejudicou o sistema aeróbico, visto que não houve produção de lactato (figura 16B). A Ucrit (figura 18) foi menor no grupo exposto à amônia fadigado em relação ao grupo controle que entrou em fadiga apenas após 96 horas de exposição, indicando que mesmo que tenha ocorrido hemoconcentração antes de 96 horas, ela não foi capaz de diminuir isoladamente a Ucrit dos peixes (figura 18B). Em 96 horas, os valores de lactato do grupo sob amônia fadigado diminuíram bruscamente, justamente no período no qual os animais desse mesmo grupo nadaram menos em relação ao controle (figura 16B). Isso indicaria que a concentração de amônia gasosa utilizada (0,3 mg/L) começa a prejudicar o sistema muscular em

algum momento entre 48 e 96 horas, impedindo completamente a contração dos músculos aeróbicos e anaeróbicos, visto que não houve qualquer aumento do hematócrito, que tende a aumentar após o exercício físico. Sendo assim, além dos distúrbios da amônia na osmorregulação, similar ao efeito do pH baixo, há possivelmente interferência da amônia na polarização dos músculos, provavelmente com NH_4^+ deslocando K^+ , como sugerido por Beumont *et al.* (2000ab).

5. Conclusões

1) A exposição a hipoxia diminui a Ucrit dos tambaquis em um primeiro momento provavelmente pelo acúmulo de lactato, que pode prejudicar até mesmo o sistema aeróbico. Em um segundo momento, quando o tambaqui ajusta seu metabolismo para lidar melhor com a hipoxia, sua Ucrit permanece baixa, provavelmente porquê a utilização do glicogênio pelos músculos brancos é substituída, pelo menos em parte, pela utilização do lactato, menos eficiente.

2) Uma vez que o tambaqui ajusta seu metabolismo para lidar com situações de hipoxia, um período de 96 horas de recuperação não parece ser suficiente para que seu metabolismo normal e sua Ucrit se restabeleçam.

3) A exposição de tambaquis a pH 3.7 por 48 horas diminui sua Ucrit, provavelmente pelo efeito da hemoconcentração, sem inchaço celular e com perda de sódio e água do plasma.

4) Uma vez que o tambaqui tem seu balanço osmótico alterado pela exposição a pH baixo, um período de 96 horas de recuperação parece ser suficiente para restabelecer seu estado fisiológico normal e sua Ucrit.

5) A exposição de tambaquis a amônia gasosa pode diminuir a Ucrit, em um primeiro momento, devido a hemoconcentração, causada pela perda de sódio e água do plasma. Em um segundo momento, há interferência da amônia na polarização dos músculos, diminuindo definitivamente sua Ucrit.

6) Uma vez que a exposição à amônia gasosa altera o metabolismo do tambaqui, um período de 96 horas parece ser suficiente para restabelecer seu metabolismo e Ucrit normais.

7) Baseando-se em situações de exposição a hipoxia, pH baixo e altas concentrações de amônia gasosa, sugere-se que os valores adequados de Ucrit para tambaqui sejam a partir de 5,4 comprimentos de corpo por segundo, valor acima da variância mínima do grupo controle, que indicaria uma condição segura para o manejo dos animais.

6. Referências bibliográficas

- Almeida-Val, V. M. F.; Val, A. L.; Hochachka, P. W. 1993. Hypoxia Tolerance in Amazon Fishes: Status of an Under-Explored Biological "Goldmine". In: Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation. Hochachka, P. W.; Lutz, P. L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Thillart, G. V. Eds. CRC Press. Boca Raton. Amazonas. Manaus. Brazil.
- Araújo-Porto, M. S. 2005. Indicadores de estresse em peixes da Amazônia: sensibilidade *versus* tipo de estressor. Dissertação de mestrado. INPA/UFAM; 38p.
- Azevedo, P. 1972. A piscicultura, histórico, considerações gerais e perspectivas futuras. In: Poluição e Piscicultura. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai. Faculdade de Saúde Pública da USP (ed). São Paulo. SP. 458 p.
- Barton, B. A.; Morgan, J. D.; Vijayan, M. M. 2002. Physiological and Condition-Related indicators of environmental stress in fish, p. 111-148. In: Biological indicators of aquatic ecosystems stress. S. M. Adams (ed.). American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Beaumont, M. W.; Butler, P. J.; Taylor, E. M. 1995. Plasma ammonia concentration in Brown trout in soft water and its relation to decreased swimming performance; *Journal of Experimental Biology* 198: 2213-2220.
- Beaumont, M. W.; Butler, P. J.; Taylor, E. W. 2000a. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquatic toxicology* 51: 259-271.
- Beaumont, M. W.; Taylor, E. W.; Butler, P. J. 2000b. The resting membrane potential of white muscle from brown trout (*Salmo trutta*) exposed to copper in soft, acidic water. *The Journal of Experimental Biology* 203: 2229-2236.
- Bone, Q.; Marshall, N. B.; Blaxter, J.H.S. 1995. Biology of Fishes. Second Edition. Blackie Academic & Professional. 332 p.
- Brandão, F. R.; Gomes, L. C.; Chagas, E. C.; Araújo, L. D. 2004. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v.39, n.4, p. 357-362.
- Brauner, C. J.; Val, A. L.; Randall, D. J. 1993. The effect of graded methaemoglobin levels on the swimming performance of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Experimental Biology* 185: 121-135.
- Brauner, C. J.; Jensen, F. B. 1999. O₂ and CO₂ exchange in fish: The non-linear release of Bohr/Haldane protons with oxygenation. In: Biology of Tropical

- Fishes. A. L. Val and V. M. F. Almeida-Val (eds). Pp 393-400. INPA, Manaus, Brazil.
- Brett, J.R.1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish Res. Board Can.* 21: 1183-1226
- Brown, B. A. 1976. in: Hematology: Principles and Procedures. Lea & Febiger eds. 2a edição, Philadelphia.
- Burgetz, I. J., Rojas-Vargas, A.; Hinch, S. G.; Randall, D. J. 1998. Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology* 201: 2711-2721.
- Butler, P. J.; Day, N. 1993. The relationship between intracellular pH and swimming performance of brown trout exposed to neutral and sublethal pH. *Journal of Experimental Biology.* 176:271-284
- Chao, N. L. 2001. Fishery, Diversity, and Conservation; In: Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonian, Brazil – Projeto Piaba. Chao, N. L.; Petry, P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tilusty, M. (Eds.) Universidade do Amazonas. Manaus. Brazil.
- De Boeck, G.; Alsop, D.; Wood, C. 2001. Cortisol Effects on Aerobic and Anaerobic Metabolism, Nitrogen Excretion, and Whole-Body Composition in Juvenile Rainbow Trout. *Physiological and Biochemical Zoology* 74 (6):858-868.
- Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S.; Santos, G. M. 1998. Peixes Comerciais do Médio Amazonas; Edições IBAMA; 214p.
- Food and Agriculture Organization - FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2002. Acesso em 18/05/2004. www.fao.org
- Gomes, L. C.; Roubach, R.; Araújo-Lima, C. A. R. M. 2002. Transportation of Tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*) in Amazon: Main problems. *World Aquaculture.* 33: 51-53.
- Gomes, L. C.; Roubach, R.; Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Urbinati, E. C. 2003. Transport of Pirarucu *Arapaima gigas* Juveniles in Plastic Bag. *Acta Amazônica.* 33(4): 637,642
- Hammer, C. 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry Physiology* 112A:1-20.
- Hochachka P. W. 1991. Design of Energy Metabolism. In: Offprints From Environmental and Metabolic Animal Physiology. C. L. Prosser. Ed.

- Kamper, E.J.; Zijlstra, W.G. (1964) Standardization of haemoglobinometry. In: Erythrocytometric Methods and their standardization. (Ed. Boroviczény, Ch.G.).
- Karnaky, K. J. Jr., 1998. Osmotic and Ionic Regulation. In: The Physiology of Fishes. Second Edition. D. H. Evans. Ed. Marine Science Series. CRC Press. Boca Raton.
- Kelly, S. P.; Wood, C. M. 2001. The cultured branchial epithelium of the rainbow trout as a model for diffusive fluxes of ammonia across the fish gill. *The Journal of Experimental Biology*. 2004, 4115-4124.
- Kieffer, J. D. 2000. Limits to Exhaustive Exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126A: 161-179.
- Lessard, J.; Val, A. L.; Aota, S.; Randall, D. J. 1995. Why is there no carbonic anhydrase activity available to fish plasma ?. *The journal of experimental biology*, 198: 31-38.
- Lin H.; Randall, D. J. 1991. Evidence for the presence of electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. *Journal of Experimental Biology*, 161: 119-134.
- Lin H.; Randall, D. 1993. H⁺ ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. *Journal of Experimental Biology*, 180: 163-174.
- Madara, J. L. 1988. Tight junction dynamics: Is paracellular transport regulated ? *Cell*, 53: 497-498
- Martinez M.; Guderley, H.; Dutil, J. D.; Winger, P. D.; He, P.; Walsh, S. J. 2003. Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*, 2006: 503-511.
- Moura, M. A. F. 1994. Efeito da anemia, do exercício físico e da adrenalina sobre o baço e eritrócitos de *colossoma macropomum* (Pisces). Dissertação de mestrado. INPA/UFAM
- Moyes, C. D.; West, T. G. 1995. Exercise metabolism of fish. In: Biochemistry and molecular biology of fishes, vol 4. Hochachka and Mommsen (eds.) Elsevier Science.
- Nikinmma, M. 2001. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respiration physiology* 128: 317-329.
- Peak, S. J.; Farrel, A. P. 2004. Locomotory behaviour and post-exercise physiology in relation to swimming speed, gait transition and metabolism in

- free-swimming smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *The journal of experimental biology*, 207: 1563-1575.
- Perry, S. F.; McDonald, G. 1993. In: *The Physiology of Fishes*. D. H. Evans. Ed. Marine Science Series. CRC Press. Boca Raton.
- Perry, S. F.; Gilmour, K. M.; Bernier, N. J.; Wood, C. M. 1999. Does gill boundary layer carbonic anhydrase contribute to carbon dioxide excretion: a comparison between dogfish (*Squalus acanthias*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 202: 749-756.
- Potts W. T. W. 1994. Kinetics of sodium uptake in freshwater animals: a comparison of ion exchange and proton pump Hypotheses. *American Journal of Physiology*, 266: R315-R320.
- Randall, D. J.; Perry, S. F. 1992. Catecholamines. In: *Fish Physiology*, vol XIIB. W. S. Hoar, D. J. Randall and A. P. Farrel. Eds. Academic Press. New York. pp. 255-300.
- Randall, D. J.; Tsui, T. K. N. 2002. Ammonia Toxicity in Fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45:17-23.
- Richards, J. G.; Mercado, A. J.; Clayton, C. A.; Heigenhauser, G. J. F.; Wood, C. M. 2002. Substrate utilization during graded aerobic exercise in rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 2067-2077.
- Roubach, R.; Correia, E. S.; Zaiden, S.; Martino, R. C.; Cavalli, R. O. 2003. Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*. March.
- Salama, A.; Morgan, I. J.; Wood, C. M. 1999. The linkage between Na⁺ uptake and ammonia excretion in rainbow trout: kinetic analysis, the effects of (NH₄)₂SO₄ and NH₄HCO₃ infusion and the influence of gill boundary layer pH. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 697-709.
- Shingles, A; McKenzie, DJ; Taylor, EW; Moretti, A; Butler, PJ; Ceradini, S. 2001. Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of experimental biology*, 204: 2691-2698
- Val, A. L.; Honczaryk, A. 1995. Criando peixes na Amazônia, p. 160. INPA, Manaus.
- Val, A. L. 1995. Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28: 1119-1127.
- Val, A. L. 1996. Surviving Low Oxygen Levels: Lessons From Fishes of the Amazon. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. Eds. INPA. Manaus. Brazil.

- Val, A. L.; Silva, M. N. P.; Almeida-Val, V. M. F. 1998. Hypoxia adaptation in Fish of the Amazon: a never-ending task. *S. Afr. J. Zool*, 33:107-117.
- Val, A. L., Paula-Silva, M. N., Almeida-Val, V. M. F. 2004. Estresse em peixes – Ajustes Fisiológicos e Distúrbios Organismos. In: Sanidade de organismos aquáticos. Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Lizama, M. A. P. L. (Eds.) São Paulo. Editora Varela
- Vijayan, M. M.; Pereira, C.; Grau, E. G.; Iwama, G. K. 1997. Metabolic Responses Associated with Confinement Stress in Tilapia: The Role of Cortisol. *Comparative Biochemical Physiology*, 116C: 89-95.
- Waichman, A. V.; Pinheiro, M.; Marcon, J. L. 2001. Water Quality Monitoring During the Transport of Amazonian Ornamental Fish. *In: Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonian, Brazil – Projeto Piaba*. Chao, N. L.; Petry, P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tilusty, M. (eds.). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. Brazil.
- Wang, Y.; Heigenhauser, G. J. F.; Wood, C. M. 1994. Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in Rainbow Trout white muscle: acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, ammonia, fluid volume and electrolyte metabolism. *Journal of Experimental Biology* 195:227-258
- Webb, P. W. 1998. Swimming. In: *The Physiology of Fishes*. Second Edition. D. H. Evans. Ed. Marine Science Series. CRC Press. Boca Raton.
- Wedemeyer, G. A.; Bruce, B. A.; McLeay, C. J. 1990. Stress and acclimation, p. 451-489. *In: Methods for fish biology*. C. B. Schreck and P. B. Moyle (eds.). American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- Wedemeyer, G. A. 1997. Rearing conditions: Effects on fish in intensive culture. In: Iwama, G.K.; Pickering, A.D.; Sampter, J.P.; Shreck, C.B. (Eds.) *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Editora Society for Experimental Biology. 35-71p.
- Wilson, J. M.; Laurent, P.; Tufts, B. L.; Benos, D. J.; Donowitz, M.; Vogl, A. W.; Randall, D. J. 2000. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *The Journal of Experimental Biology*, 203: 2279-2296.
- Wilson, R. W.; Wright, P. M.; Munger, S.; Wood, C. M. 1994. Ammonia excretion in freshwater rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) and the importance of gill boundary layer acidification: lack of evidence for Na⁺/Nh₄⁺ exchange. *Journal of Experimental Biology*, 191: 37-58

Wood C. M. 1993. Ammonia and Urea Metabolism and Excretion. In: The Physiology of Fishes. D. H. Evans. Ed. Marine Science Series. Boca Raton. Florida.

Wood, C. M.; Wilson, R. W.; Gonzalez, R. J.; Patrick, M. L.; Bergman, H. L.; Narahara, A.; Val, A. L. 1998. Responses of a Amazonian Teleost, the Tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in Extremely Soft Water. *Physiological Zoology*, 71(6):658-670.

Zar, J. H. 1998. Bioestatistical analysis. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.

|