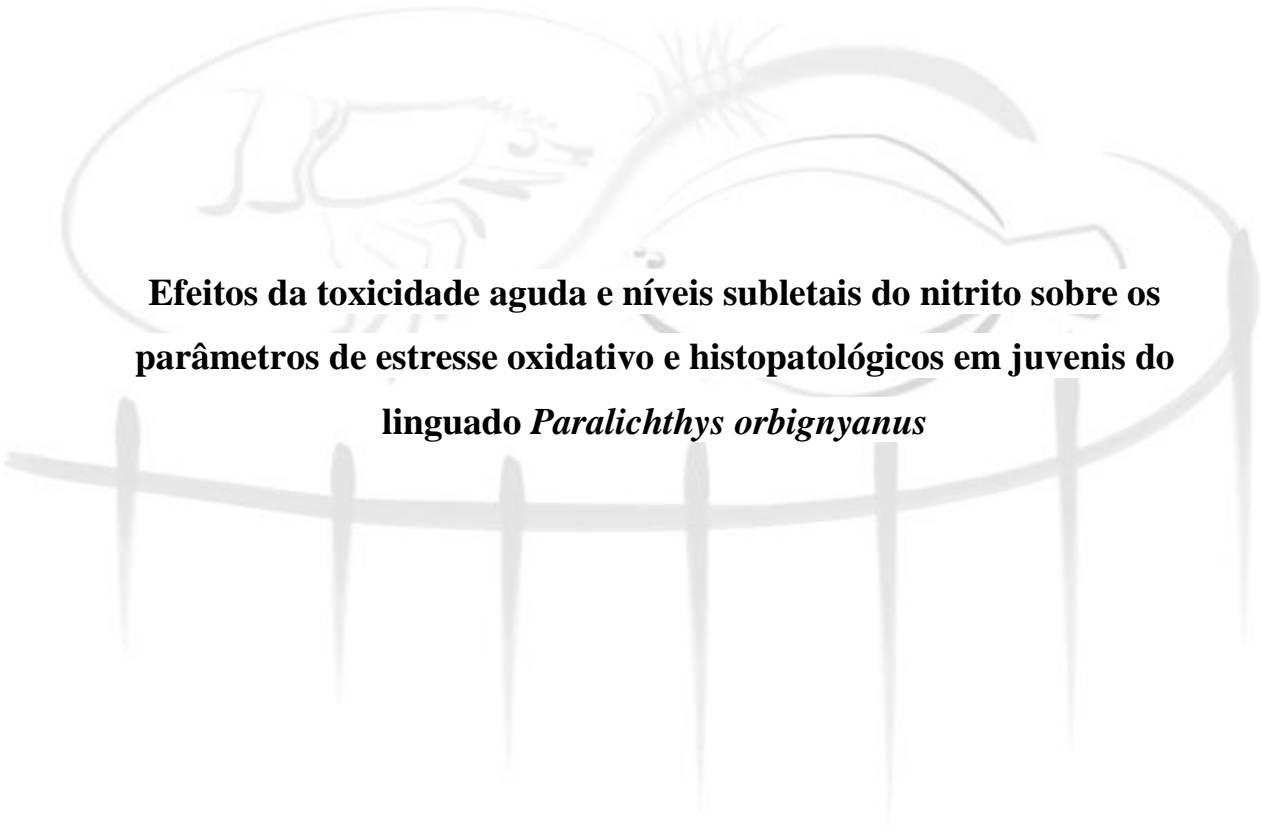


FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**Efeitos da toxicidade aguda e níveis subletais do nitrito sobre os
parâmetros de estresse oxidativo e histopatológicos em juvenis do
linguado *Paralichthys orbignyanus***

Diego Henrique de Sousa Miranda

RIO GRANDE - RS

2019

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

Efeitos da toxicidade aguda e níveis subletais do nitrito sobre os parâmetros
de estresse oxidativo e histopatológicos em juvenis do linguado
Paralichthys orbignyanus

Diego Henrique de Sousa Miranda

Orientador: Dr. Marcelo Hideo Okamoto

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em
Aquicultura no Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura
da Universidade Federal do Rio
Grande - FURG.

RIO GRANDE - RS

Agosto de 2019

Índice

Resumo.....	4
Abstract	5
1. Introdução	6
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos.....	14
3.1. Produção dos juvenis e condições experimentais.....	14
3.2. Análises de estresse oxidativo.....	15
3.3. Análises histopatológicas	16
3.4. Análise estatística.....	16
4. Resultados	16
5. Discussão.....	20
6. Conclusões	23
7. Referências Bibliográficas	24

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar a toxicidade aguda e os efeitos subletais do nitrito nos parâmetros de estresse oxidativo e histopatológicos em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* ($0,39 \pm 0,13\text{g}$ e $3,15 \pm 0,41\text{cm}$). Os peixes (sete por unidade experimental) foram expostos em sete concentrações de nitrito (Controle – sem adição de nitrito; 20, 40, 80, 160, 320 e 640mg NO_2^- -N/L) em triplicata por um período de 96h. Os tanques foram monitorados a cada 24h para verificação de possível mortalidade e estimativa da CL_{50} . Ao final do período experimental foram coletados peixes (exceto na concentração mais alta, onde houve mortalidade total) para as análises de estresse oxidativo e de histopatologia. Foram observadas mortalidades apenas nas concentrações a partir de 320mg NO_2^- -N/L e os valores de CL_{50} variaram entre 427,8 a 393,1mg NO_2^- -N/L para 24 e 96h, respectivamente. A ACAP apresentou redução gradativa nos peixes expostos em níveis de nitrito a partir de 160mg NO_2^- -N/L. A atividade da GST foi significativamente maior nos tratamentos de 80, 160 e 320mg NO_2^- -N/L. Na concentração de 320mg NO_2^- -N/L os níveis de TBARS foram maiores em relação ao Grupo Controle. Os níveis de NPSH foram maiores nos tratamentos de 160 e 320mg NO_2^- -N/L em comparação com o Controle, 20 e 40mg NO_2^- -N/L, assim como os níveis de PSH, que também foram maiores nos peixes expostos às concentrações de 160 e 320mg NO_2^- -N/L. Sendo assim, uma condição pró-oxidante foi induzida nos juvenis quando expostos em concentrações a partir de 80mg NO_2^- -N/L, a qual foi evidenciada por alterações no sistema antioxidante e aumento nos níveis de dano oxidativo. A exposição até 320mg NO_2^- -N/L por 96h não induziu nenhuma alteração histopatológica nas brânquias e fígado dos animais. Os presentes resultados demonstram que o linguado é uma espécie que apresenta elevada tolerância ao nitrito, porém recomenda-se que as concentrações deste composto no ambiente de criação não excedam 40mg NO_2^- -N/L.

Palavras-chave: dano oxidativo; nitrogênio; piscicultura marinha; linguado; antioxidante.

Abstract

This study evaluated the acute toxicity and sublethal effects of nitrite on oxidative stress and histopathological parameters of early juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Fish were exposed to control, 20, 40, 80, 160, 320 and 640mg NO₂⁻N-L⁻¹, in triplicate for 96h. Every 24h the tanks were monitored to check possible mortality to estimate the LC₅₀. At the end of the experiment, fish were collected for stress oxidative and histopathological analysis. The LC₅₀ ranged from 427.8 to 393.1mg NO₂⁻N-L⁻¹ for 24 and 96h, respectively. ACAP showed gradual reduction in fish exposed to nitrite levels from 160mg NO₂⁻N-L⁻¹. GST activity was higher in 80, 160 and 320mg NO₂⁻N-L⁻¹. NPSH and PSH levels were higher in 160 and 320mg NO₂⁻N-L⁻¹ compared to the Control, 20 and 40mg NO₂⁻N-L⁻¹. TBARS level was significantly higher in fish exposed to 320mg NO₂⁻N-L⁻¹ than the Control and 20mg NO₂⁻N-L⁻¹. No histopathological changes were evidenced in the gills and liver of exposed fish. Moreover, a pro-oxidant condition was induced when *P. orbignyanus* were exposed to concentrations from 80mg NO₂⁻N-L⁻¹, which was evidenced by alterations in the antioxidant system and increased levels of oxidative damage. Therefore, it is recommended that the concentrations in the environment do not exceed 40mg NO₂⁻N-L⁻¹ in order to avoid oxidative stress in this species.

Keywords: oxidative damage; nitrogen; marine fish; flounder; antioxidant.

1. Introdução

Em uma escala global, a pesca e a aquicultura são atividades importantes para o fornecimento de alimento e renda para milhões de pessoas. Devido à estagnação da captura de pescado proveniente da pesca no fim da década de 1980, acompanhado a um rápido aumento da demanda do pescado, a aquicultura se tornou o setor de produção de alimentos de origem animal que mais cresce no mundo, representando atualmente mais de 50% do fornecimento de pescado (FAO 2018). Dentre os países com maior potencial para aquicultura, o Brasil tem papel de destaque, em especial por sua disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas que compatibilizam interesse comercial e científico (Brasil 2014). O país encontra-se na 13^o posição no ranking dos países com maior produção aquícola do mundo, sendo a piscicultura continental a principal responsável por esta produção (FAO 2018).

Em contrapartida, a piscicultura marinha ainda está em estágio inicial no país (FAO 2018), mesmo possuindo um extenso litoral e uma abundância de espécies marinhas e estuarinas com potencial para aquicultura. Os principais obstáculos para o crescimento da piscicultura marinha no Brasil estão associados a falta de insumos (rações, equipamentos, estruturas de produção) e serviços especializados (mão de obra, seguro aquícola), além da ineficiência nas questões legais para concessão de águas públicas e licenciamento ambiental (Cavalli et al. 2011). O desenvolvimento de pacotes tecnológicos adequados para criação de espécies nativas com potencial para aquicultura também são peças-chave para impulsionar a atividade. Algumas espécies são consideradas promissoras para a piscicultura marinha brasileira, podendo ser citados o robalo-peva *Centropomus parallelus* e robalo-flecha *Centropomus undecimalis*, o bijupirá *Rachycentron canadum*, a tainha *Mugil liza* e o linguado *Paralichthys orbignyanus* (Baldisserotto e Gomes 2010; Cerqueira et al. 2017).

Pertencente à ordem Pleuronectiformes, o linguado (Figura 1) é um peixe plano (Figueiredo e Menezes 2000) caracterizado por sofrer por uma abrupta metamorfose durante a fase larval, envolvendo a transição da simetria bilateral do corpo para um formato assimétrico e comprimido dorso-ventralmente, acompanhado pela migração de um dos olhos para o lado oposto da cabeça, além da mudança do comportamento pelágico para demersal (Nelson 2006).



Figura 1. Exemplar adulto do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Fonte: Marcelo Okamoto.

O linguado *P. orbignyanus* (Valenciennes 1839) é uma espécie bentônica, carnívora e que está distribuída desde o litoral do Rio de Janeiro, no Brasil, até a região de Mar del Plata, na Argentina, em águas da plataforma continental até aproximadamente 20m de profundidade, sendo comum em regiões estuarinas (Lema et al. 1980; Cousseau e Perrotta 1998; Figueiredo e Menezes 2000). Alguns exemplares podem atingir mais de 100cm de comprimento total e peso de aproximadamente 10kg (Bianchini et al. 2010). Seu valor comercial é elevado, apresenta excelente qualidade de carne e um alto rendimento de filetagem (Robaldo et al. 2012), mostrando-se um importante recurso da pesca na costa do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina (Díaz de Astarloa 2002).

Além disso, alguns estudos demonstram que o linguado tem capacidade de tolerar uma ampla faixa de variação de diversos parâmetros físico-químicos e de qualidade de água como pH, temperatura, salinidade e elevadas concentrações de compostos nitrogenados (Bianchini et al. 1996; Wasielesky et al. 1997; Wasielesky et al. 1998; Sampaio e Bianchini 2002). Outro aspecto que favorece esta espécie é que o processo de maturação e desova, bem como a sua larvicultura têm sido realizadas com sucesso em cativeiro, permitindo a produção de juvenis com taxas consideradas boas de sobrevivência (Sampaio et al. 2008).

Para produzir uma determinada espécie, conhecer os limites de tolerância e a manutenção da qualidade de água é requisito indispensável nos sistemas de criação, o que influencia diretamente no sucesso ou fracasso de sua produção (Ostrensky e Wasielesky 1995; Boyd e Tucker 2012; Campos et al. 2012). A intensificação dos sistemas de produção na aquicultura é importante para permitir o desenvolvimento sustentável da atividade, visto que irá proporcionar um aumento na produtividade (Klinger e Naylor 2012). Porém com o aumento da densidade de estocagem um maior

monitoramento da qualidade de água é necessário para evitar que os organismos sejam mantidos em condições que afetem o seu bem-estar e o desempenho dos mesmos (Boyd e Tucker 2012).

Dentro dos sistemas de criação de organismos aquáticos, sobretudo em sistemas intensivos, os resíduos nitrogenados podem se tornar um problema em termos de qualidade de água (Tomasso 1994; Campos et al. 2012). Apesar de o nitrogênio ser indispensável aos organismos e ocorrer de forma natural no meio, o problema associado ao acúmulo deste nutriente no ambiente de cultivo está relacionado ao fato de que, em certas concentrações podem atingir níveis tóxicos os quais podem ocasionar alterações fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e comportamentais, e em casos mais extremos ocasionar mortalidade dos peixes (Randall e Tsui 2002; Jensen 2003; Schram et al. 2010; Baldisserotto et al. 2014). As formas nitrogenadas que podem atingir níveis tóxicos aos organismos dentro dos sistemas de produção e que necessitam de atenção especial são principalmente a amônia e o nitrito (Tomasso 1994; Rodrigues et al. 2007).

A excreção dos organismos cultivados e a decomposição de matéria orgânica, são as principais fontes destes compostos na piscicultura intensiva (Gross et al. 2000). Em sistemas tradicionais de produção, quando a densidade de organismos é menor, em geral são observados baixos níveis de amônia – composto resultante do catabolismo das proteínas – que aumentam de acordo com a quantidade de alimento fornecido e ao aumento da biomassa (Queiroz e Boeira 2007). No caso da criação de peixes carnívoros, como é o caso do linguado, esta situação pode ser dificultada em virtude dos elevados níveis de proteína usados nas rações (Hurvitz et al. 1997; Baldisserotto 2013). O uso do sistema de recirculação de água (SRA) é uma alternativa para se intensificar a produção, sem que estes compostos atinjam concentrações indesejáveis.

Nos SRA, o controle dos níveis de amônia e nitrito ocorre durante o processo de nitrificação, quando a água passa pelo biofiltro. Este processo envolve duas etapas, nas quais amônia é oxidada a nitrito, e este por sua vez a nitrato, pela ação de bactérias nitrificantes, como por exemplo, as do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (Baldisserotto 2013). Como produto da nitrificação, o nitrato tende a acumular em SRA (Ebeling e Timmons 2012), porém este composto é menos tóxico para os peixes, principalmente em água salgada, tornando-se problema apenas em concentrações extremamente altas (Baldisserotto 2013).

O nitrito é o composto intermediário na nitrificação bacteriana da amônia a nitrato (em meios oxidantes), ou produto da denitrificação do nitrato (em ambientais

redutores), e sua toxicidade varia em função da concentração no meio e de diversos outros fatores bióticos e abióticos, como por exemplo o estágio de desenvolvimento em que se encontram os organismos produzidos (Svobodova et al. 2005; Kroupova 2005). Este composto pode ser encontrado em duas formas na água, o ácido nitroso (HNO_2) e o nitrito ionizado (NO_2^-), e o equilíbrio entre as duas formas se dá pelo pH. Em valores de pH da água acima de 5,5 apenas o nitrito ionizado estará presente, portanto, esta é a forma que ocasiona a toxicidade em sistemas de produção (Baldisserotto 2013).

Uma vez que se encontra no ambiente de criação, pode ser absorvido ativamente através do epitélio branquial e atingir concentrações muito elevadas nos fluídos corporais (Machado 1999; Kroupova 2006). O nitrito é ativamente absorvido pelas brânquias via antiporte em competição com cloreto (Jensen 2003). De acordo com isso, a competição pelo mesmo transportador em salinidades elevadas pode reduzir a toxicidade do composto (Wuertz et al. 2013). Contudo, a entrada de nitrito pode ocorrer por difusão a favor do gradiente eletroquímico (Jensen 2003; Baldisserotto 2013). Outra importante via de absorção do nitrito em peixes marinhos ou adaptados a água do mar é através do intestino. Por serem hiposmóticos em relação ao meio, os peixes precisam beber água para compensar a perda por osmose, e o nitrito é absorvido em substituição ao cloreto nos simportes $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ e $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$ (Grosell e Jensen 2000). O acúmulo de nitrito no plasma sanguíneo causa a oxidação da hemoglobina (Hb), formando a metahemoglobina (MetHb) que não é capaz de transportar oxigênio, podendo ocasionar hipóxia funcional nos peixes (Almendras 1987; Kroupova 2006). Devido ao alto nível de metahemoglobina, sangue apresenta uma coloração marrom-chocolate. Por isso, a intoxicação por nitrito também é conhecida como doença do sangue marrom. Como consequência, as condições hipóxicas causadas pela metahemoglobina comprometem vários órgãos dos peixes, como por exemplo o fígado. A hipóxia tecidual e a produção de energia anaeróbica podem se refletir em concentrações elevadas de lactato plasmático. Além disso, o nitrito também induz alterações lisossomais e mitocondriais no fígado do peixe, resultando em um aumento na instabilidade dessas organelas (Kroupova 2005). Estudos demonstram que diversos efeitos fisiológicos são expressados devido a toxicidade do nitrito, sendo a mortalidade resultante de diversos efeitos e a formação da metahemoglobina é apenas um deles (Kroupova 2006; Hansen e Jensen 2010).

O estresse pode ser caracterizado como uma resposta bioquímica desencadeada por compostos endógenos, que podem estar relacionados as variáveis ambientais e/ou

poluentes (Montserrat et al. 2007; Stoliar e Lushchak 2012). Alguns estudos mais atuais demonstraram que a exposição ao nitrito pode induzir ao estresse oxidativo em peixes (Jensen et. 2015; Maltez et al. 2018). O oxigênio é indispensável para a produção de energia, assim como é essencial para a vida. Porém o oxigênio possui a capacidade de gerar substâncias tóxicas a partir da sua biotransformação em espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo causar danos irreversíveis aos organismos. As ERO estão envolvidas em vários processos degenerativos, pelo fato de algumas serem radicais livres capazes de atacar biomoléculas, além de serem altamente reativas. Os radicais livres mais conhecidos são os ânions radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Todo organismo aeróbico possui um sistema de defesa antioxidante composto de complexos enzimáticos e não enzimáticos que atuam diretamente ao combate a formação das ERO, tentando neutralizar sua ação e beneficiando o reparo de moléculas que sofreram danos oxidativos. As enzimas antioxidantes mais comuns são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase (GST), e os antioxidantes não enzimáticos são a glutathione reduzida (GSH) (Halliwell e Gutteridge 2015), sendo todas estas encontradas nos tecidos dos peixes (Martínez-Álvarez et al. 2005).

Existem diferentes respostas ao estresse, as quais podem ser classificadas em primárias, secundárias e terciárias. A resposta primária é neuroendócrina, na qual há a liberação de catecolaminas e hormônios corticosteroides na corrente sanguínea. As respostas secundárias são usualmente definidas como a canalização das ações e dos efeitos imediatos desses hormônios em nível sanguíneo e tecidos, incluindo aumento dos batimentos cardíacos e da absorção de oxigênio, a mobilização de substratos de energia e, ainda a alteração de processos da osmorregulação. As respostas terciárias afetam os indivíduos comprometendo ou prejudicando o desempenho de crescimento, reprodução, sistema imune e comportamento (Barton 2002; Wendelaar Bonga 2011).

Geralmente, as células animais tendem a manter a condição biológica basal entre os agentes oxidantes e antioxidantes (Halliwell e Gutteridge 2007). O estresse oxidativo pode ser definido então como um aumento na concentração de ERO devido a um estado de desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, os quais podem resultar em danos celulares em macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios, que podem ter suas funções biológicas comprometidas ou perdidas (Lushchak 2011; Halliwell e Gutteridge 2015). O estresse oxidativo em peixes expostos ao nitrito pode ser desencadeado pelo aumento na produção intracelular de ERO (Sun et al. 2014) e espécies reativas de

nitrogênio (ERN) (Jensen e Hansen 2011; Jensen et al. 2015) e/ou devido ao comprometimento de diferentes defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (Jia et al. 2015). Maltez et al. (2018) demonstraram que ocorrem alterações no sistema antioxidante e níveis de dano oxidativo em juvenis do linguado produzidos em cativeiro, quando expostos a 15mg NO₂⁻-N/L durante 10 dias.

O efeito do nitrito também foi demonstrado sobre a atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em juvenis do robalo-peva *C. parallelus* (Rodrigues et al. 2018). A toxicidade aguda do nitrito é extremamente variável entre os peixes, sendo de uma forma geral os peixes de água doce mais sensíveis que os peixes marinhos. Estudos demonstraram que a concentração letal mediana (CL₅₀) em 96h para matrinxã (*Brycon amazonicus*) foi estimada em 0,86mg NO₂⁻-N/L (Avilez et al. 2004), enquanto para juvenis da tilápia (*Oreochromis niloticus*) foi estimada em 28mg NO₂⁻-N/L (Wang et al. 2006). Por outro lado, com relação as espécies marinhas a CL₅₀ do nitrito chega a 199mg NO₂⁻-N/L como observado para o peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*) (Sampaio et al. 2006) e de 675 mg NO₂⁻-N/L para milkfish (*Chanos chanos*) (Almendras 1987). Para exemplares selvagens do linguado *P. orbignyanus*, com peso médio de 120g, a CL_{50-96h} do nitrito foi estimada em duas condições experimentais de salinidade e temperatura, denominadas de condição de inverno de (0‰ e 12°C) e condição de verão (30‰ e 25°C), sendo que os valores obtidos foram de 30,57mg NO₂⁻-N/L e 24,01mg NO₂⁻-N/L, respectivamente (Bianchini et al. 1996).

Quando o organismo passa por um estado de dano oxidativo em consequência de um estresse prologado ou em níveis muito altos, além de afetar as funções fisiológicas e bioquímicas, pode causar danos teciduais, como por exemplo, o aparecimento de histopatologias, que podem alterar e danificar as funções dos órgãos dos peixes (Machado 1999; Bernet et al. 1999; Simonato et al. 2008; Sun et al. 2014). De acordo com isso, avaliar os efeitos de componentes tóxicos aos peixes por meio de análises histopatológicas é muito importante (Liebel et al. 2013; Rodrigues et al. 2014; Medeiros et al. 2016). Existem diferentes metodologias empregadas para estudos histopatológicos, como por exemplo as análises descritivas (Saoud et al. 2014) e quantitativas (Reiser et al. 2010). Além disso, há indicadores que mensuram o grau de lesão do órgão estudado (Bernet et al. 1999).

Para estudos de avaliação dos efeitos de compostos nitrogenados em peixes, são geralmente utilizados o fígado e as brânquias, que são órgãos diretamente afetados pelos tóxicos, dando uma melhor perspectiva na visualização dos danos causados (Park et al.

2007; Dong et al. 2013; Wuertz et al. 2013; Rodrigues et al. 2014; Saoud et al. 2014). Nas brânquias esta avaliação se dá pelo fato de que toda a superfície está em contato direto e constante com a água e com os compostos presentes nela (Bernet et al. 1999). Além disso, as brânquias estão ligadas aos mecanismos relacionados à absorção e eliminação de amônia e nitrito pelo organismo (Jensen 2003; Ip e Chew 2010). As alterações histopatológicas branquiais em peixes expostos aos compostos nitrogenados mais comuns são a hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais, hipertrofia de células de cloreto, fusão lamelar, descolamento do epitélio branquial e telangiectasia (Machado 1999; Rodrigues et al. 2014; Saoud et al. 2014; Medeiros et al. 2016). O fígado é o órgão que está ligado a várias funções vitais, dentre elas, os processos de biotransformação e detoxificação de xenobióticos (Bernet et al. 1999). A intoxicação pelos compostos nitrogenados pode acarretar alterações a níveis estruturais, bioquímicos e moleculares, que podem causar lesões no tecido (Bernet et al. 1999), como por exemplo a dilatação sinusoidal, degeneração hidrópica, deposição lipídica nos hepatócitos, desintegração de hepatócitos e necrose (Benli et al. 2008; Rodrigues et al. 2014; Thangam 2014).

Considerando que o estresse relacionado a níveis elevados de nitrito nos sistemas de produção é um risco em potencial, sobretudo na aquicultura intensiva, reconhecer as respostas biológicas envolvidas e os limites de tolerância do organismo cultivado é fundamental para estabelecer uma estratégia de manejo adequada, assegurando o bem-estar animal e a produção (Iwama et al. 2011). Deve-se considerar ainda que, a toxicidade de compostos nitrogenados pode variar muito de acordo com a fase de vida ou tamanho do organismo (Hamilin 2006; Gomułka et al. 2014; Wang et al. 2015), e que os trabalhos relacionados a toxicidade do nitrito para o linguado estão limitados apenas para juvenis com tamanho acima de 100g, justificando a realização do presente trabalho.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade aguda e os efeitos subletais do nitrito nos parâmetros de estresse oxidativo e alterações histopatológicas em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*.

Objetivos Específicos

- Estimar a concentração letal mediana (CL₅₀) do nitrito em juvenis do linguado *P. orbignyanus* em 24, 48, 72 e 96h de exposição;
- Avaliar os efeitos da exposição em concentrações subletais de nitrito no sistema de defesa antioxidante e nos níveis de dano oxidativo em juvenis do linguado *P. orbignyanus*.
- Verificar a ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias e fígado de juvenis do linguado *P. orbignyanus* submetidos em concentrações subletais de nitrito.

3. Material e Métodos

3.1. Produção dos juvenis e condições experimentais

O protocolo experimental aplicado neste estudo foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal do Rio Grande (Número de processo **23116.006540/2018-32**). Os juvenis do linguado *P. orbignyanus* foram produzidos no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha – LAPEM, de acordo com Sampaio et al. (2008). Antes do ensaio de exposição, os peixes foram aclimatados às condições experimentais por duas semanas em SRA, compostos por três tanques de 300L equipados com tanque de sedimentação, esterilizador UV, controlador de temperatura, filtro mecânico e filtro biológico. Durante esse período, os peixes foram alimentados sete vezes ao dia com ração comercial (52% de proteína bruta) até a saciedade. Após o período de aclimação, 147 peixes ($0,39 \pm 0,13\text{g}$ e $3,15 \pm 0,41\text{cm}$) foram distribuídos aleatoriamente em 21 tanques cilíndricos de 6L (sete peixes por tanque) e depois expostos a sete concentrações de nitrito (Tabela 1) em triplicata por 96h.

As concentrações de nitrito foram alcançadas através da adição de nitrito de sódio (NaNO_2 ; Synth, Brasil). A verificação analítica das concentrações desejadas foi realizada diariamente, de acordo com Bendschneider e Robinson (1952). O experimento foi realizado em sistema semi-estático com 50% de renovação de água por dia. Durante este procedimento, a água utilizada para as renovações foi previamente preparada com as mesmas concentrações de nitrito de cada tratamento. As unidades experimentais foram mantidas em banho termostatizado, providas individualmente com aeração por sopradores conectados às pedras de ar. A alimentação foi interrompida 24h antes do início e durante todo o período experimental. Temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro MODEL 550A, YSI, EUA), salinidade (refratômetro portátil digital ATAGO S-MILL-E, Japão), pH (medidor de pH digital pH 100A ECOSENSE, YSI, China), alcalinidade (Eaton et al. 2005) e amônia total (UNESCO 1983) foram medidas diariamente durante o período de aclimação e experimentação (Tabela 1). O fotoperíodo foi mantido em 16h claro: 8h escuro.

A cada 24h, os tanques foram monitorados para verificar a possível mortalidade. Peixes sem movimento opercular e sem resposta a estímulos mecânicos foram considerados mortos e removidos dos tanques para evitar a deterioração da qualidade da água. Ao final do período experimental, seis peixes por tanque foram eutanaziados com benzocaína (300ppm), exceto no tratamento $640\text{mg NO}_2^- \text{-N/L}$, devido à mortalidade

total dos peixes antes das 96h. Três peixes de cada tanque foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C em um ultra freezer para análises de estresse oxidativo. Os outros três peixes de cada tratamento foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24h e depois transferidos para etanol 70% para análises histológicas.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água aferidos durante o período experimental

Parâmetros	Tratamentos						
	Controle	20	40	80	160	320	640
Concentração de nitrito (mg NO_2^- -N/L)	$0,1 \pm 0,05$	$21 \pm 1,03$	$43 \pm 2,48$	$83 \pm 3,69$	$169 \pm 6,22$	$331 \pm 15,14$	$553 \pm 41,63$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$22,48 \pm 0,16$	$22,48 \pm 0,16$	$22,48 \pm 0,16$	$22,48 \pm 0,16$	$22,48 \pm 0,16$	$22,48 \pm 0,16$	$22,48 \pm 0$
Oxigênio dissolvido	$7,47 \pm 0,31$	$7,34 \pm 0,33$	$7,28 \pm 0,24$	$7,34 \pm 0,08$	$7,36 \pm 0,06$	$7,30 \pm 0,10$	$7,37 \pm 0$
Salinidade	34 ± 0	34 ± 0	34 ± 0	34 ± 0	34 ± 0	$34,9 \pm 0,25$	35 ± 0
pH	$7,58 \pm 0,35$	$7,62 \pm 0,34$	$7,59 \pm 0,40$	$7,62 \pm 0,35$	$7,68 \pm 0,33$	$7,65 \pm 0,29$	$8,0 \pm 0,01$
Alcalinidade (CaCO_3)	$94,17 \pm 50,34$	$99,17 \pm 44,76$	$98,33 \pm 45,58$	$99,17 \pm 44,87$	$113,33 \pm 29,26$	$131,67 \pm 10,32$	$140,00 \pm 0$
Amônia total (mg N-TAN/L)	$0,11 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$

3.2. Análises de estresse oxidativo

Os peixes foram homogeneizados (1:5 w/v) em solução tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,75) contendo EDTA (2 mM) e Mg^{2+} (5 mM) (da Rocha et al. 2009) usando um sonicador (QSonica®, Q55). Os sobrenadantes resultantes da centrifugação (10.000 x g por 20 minutos a 4°C) foram armazenados a -80°C até análises posteriores. O conteúdo total de proteínas do homogeneizado foi determinado pelo método Biuret usando kit comercial (Doles®). A atividade da enzima GST foi avaliada por quantificação do conjugado formado por glutathiona reduzida 1 mM (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al. 1974; Habig e Jakoby 1981). As amostras foram previamente diluídas com tampão de homogeneização para 2,0mg de proteína m/L e a ACAP foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Amado et al. (2009). Os dados da ACAP são expressos em área relativa, que uma área relativa mais alta significa uma menor capacidade antioxidante. Os tióis não proteicos (NPSH) e proteicos (PSH) foram medidos usando um método baseado no uso de DTNB (5,5-

ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico; Sigma®), como proposto por Sedlak e Lindsay (1968). Foi medida após a desproteinização dos homogeneizados com ácido tricloroacético. O sedimento formado pela proteína precipitada foi ressuspenso com tampão de homogeneização para determinação do conteúdo de PSH. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Oakes e Van Der Kraak 2003). Os resultados foram expressos em nmol TMP m/g de tecido úmido, onde TMP significa tetrametoxipropano (ACROS Organics), usado no estabelecimento da curva padrão. Todas as análises foram realizadas com espectrofluorímetro (BioTek®, Synergy HT).

3.3. Análises histopatológicas

As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, depuradas em xileno e impregnadas em Paraplast®. As seções (5µm) foram preparadas utilizando um micrótomo (MRP03, LUPETEC®, Brasil) e subsequentemente coradas com hematoxilina-eosina (H-E). A avaliação histopatológica foi realizada em microscópio óptico (ZEISS Primo Star).

3.4. Análise estatística

A concentração letal mediana (CL₅₀) de nitrito e seus intervalos de confiança (IC 95%) foram estimados por 24, 48, 72 e 96h usando o software Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977). Os dados dos parâmetros do estresse oxidativo estão expressos como média ± desvio padrão. A normalidade e a homoscedasticidade foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados da atividade GST, ACAP, NPSH e PSH foram submetidos à ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey para verificar as diferenças entre os tratamentos. Os dados do TBARS foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla. O nível de significância foi estabelecido em 5% (p <0,05) para todas as análises.

4. Resultados

Foram observadas mortalidades nas concentrações de 320mg NO₂⁻-N/L com 100% de mortalidade no tratamento 640mg NO₂⁻-N/L em 24h. Os valores estimados para CL₅₀ variaram entre 427,84 e 393,09 NO₂⁻-N/L por 24 e 96h, respectivamente

(Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade acumulada (%) para juvenis de *Paralichthys orbignyanus* expostos a diferentes concentrações de nitrito por 96 horas e valores estimados de concentração letal mediana (CL₅₀) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%).

Horas	Tratamentos							CL ₅₀ (IC)
	Controle	20	40	80	160	320	640	
24	0	0	0	0	0	0	100	427,84*
48	0	0	0	0	0	4,8	-	415,92 (393,62 – 439,49)
72	0	0	0	0	0	9,5	-	404,34 (374,77 – 436,26)
96	0	0	0	0	0	14,3	-	393,09 (359,06 – 430,34)

* Não foi possível determinar o intervalo de confiança devido à falta de variação entre os dados.

A ACAP foi significativamente menor (maior área relativa) nos peixes expostos a 320mg de NO₂⁻-N/L em relação a todos os outros tratamentos. A ACAP também foi menor no tratamento com 160mg de NO₂⁻-N/L quando comparado ao grupo controle com 80mg de NO₂⁻-N/L (Figura 2).

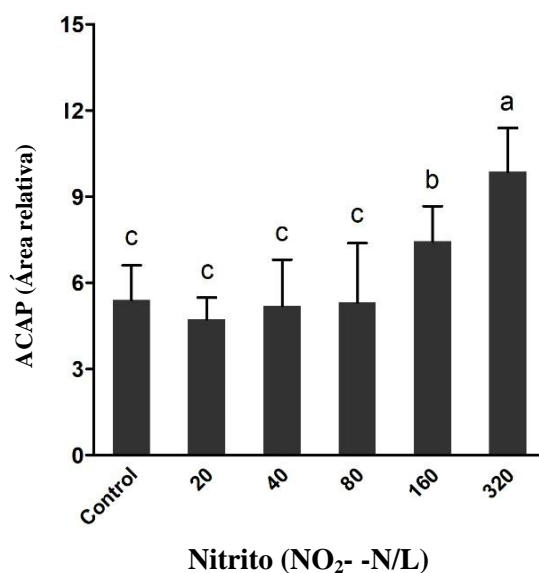


Figura 2. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (área relativa) em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* expostos a diferentes concentrações de nitrito por 96 horas. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (ANOVA e Tukey, p <0,05).

A atividade de GST foi maior nos tratamentos 80 e 320mg de NO₂⁻-N/L quando comparado ao grupo controle, 20 e 40mg de NO₂⁻-N/L. Nos peixes expostos a 160mg de NO₂⁻-N/L, a atividade de GST foi significativamente maior em relação ao controle e

20mg de NO_2^- -N/L (Figura 3).

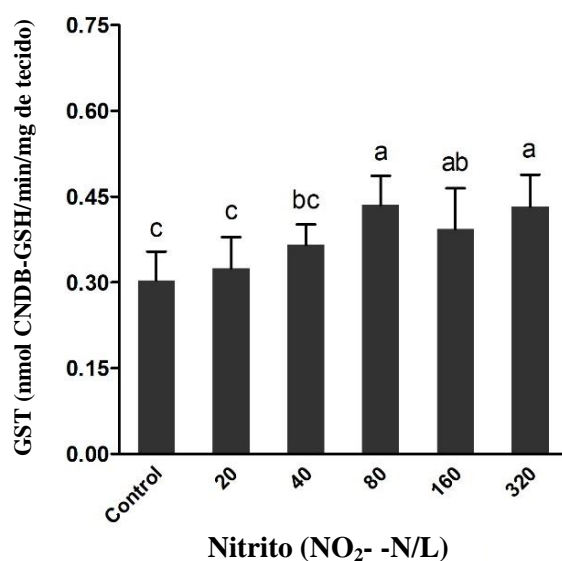


Figura 3. Atividade da glutatona-S-transferase (GST) (nmol CNDB-GSH / min / mg de tecido) em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* expostos a diferentes concentrações de nitrito por 96 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$).

O conteúdo de NPSH foi maior nos tratamentos de 160 e 320mg de NO_2^- -N/L em comparação com o controle e o tratamento de 40mg de NO_2^- -N/L (Figura 4).

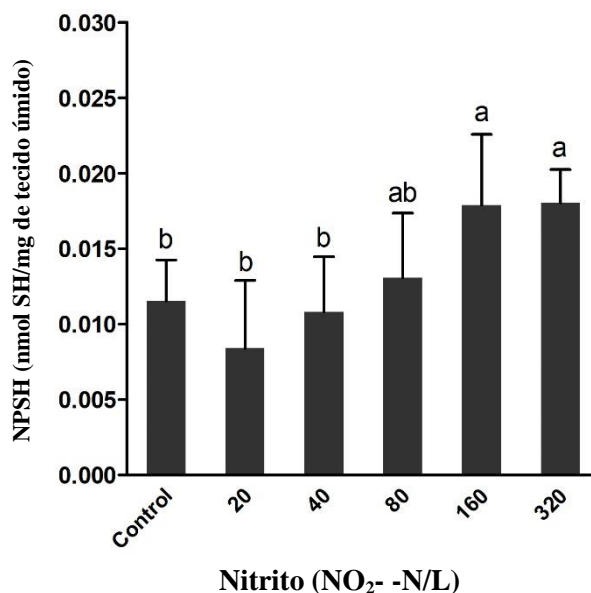


Figura 4. Teor de tióis não proteicos (NPSH) (nmol SH mg / tecido úmido) em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* expostos a diferentes concentrações de nitrito por 96 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (ANOVA e Tukey, $p < 0,05$).

O PSH foi significativamente maior nos peixes expostos a 160 e 320mg de NO_2^- -N/L do que nos outros tratamentos (Figura 5).

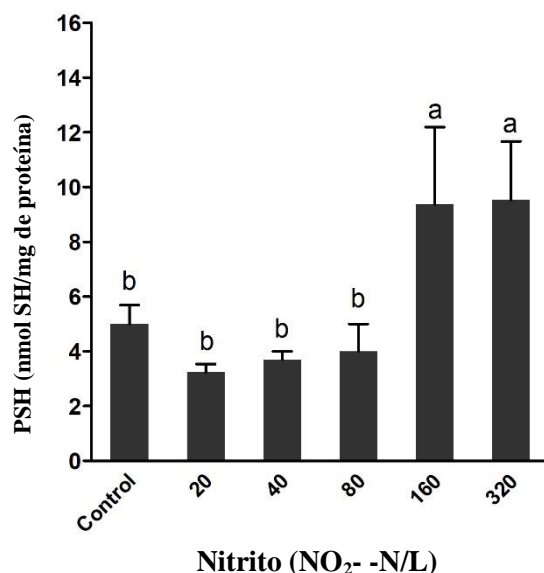


Figura 5 – Teor de proteínas tíois (PSH) (nmol SH mg / tecido úmido) em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* expostos a diferentes concentrações de nitrito por 96 horas. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (ANOVA e Tukey, $p < 0,05$).

O nível de TBARS foi significativamente maior nos peixes expostos a 320mg de NO₂⁻-N/L do que o controle e 20 mg de NO₂⁻-N/L. Os animais submetidos a 80mg de NO₂⁻-N/L apresentaram maiores níveis de TBARS quando comparados aos expostos a 20mg de NO₂⁻-N/L (Figura 6).

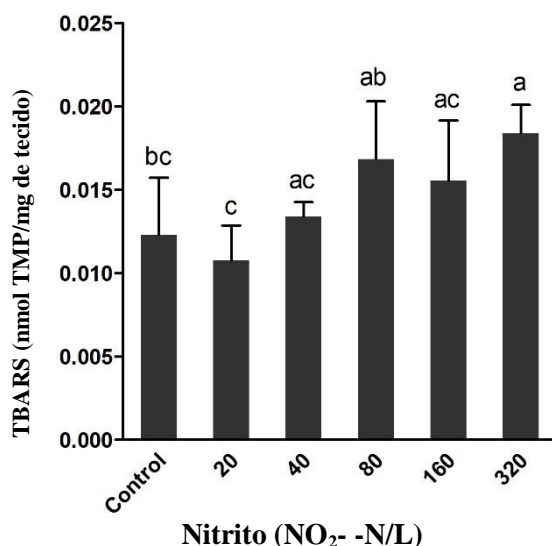


Figura 6. Teor de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol TMP / mg de tecido) em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* expostos a diferentes concentrações de nitrito por 96 horas. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (Kruskall-Wallis e teste de comparação múltipla, $p < 0,05$).

As brânquias e fígados analisados não apresentaram alterações histológicas, mesmo dos peixes expostos à concentração de 320mg de NO₂⁻-N/L durante as 96h de

experimento.

5. Discussão

Em sistemas de produção intensivos, como o SRA, o processo de nitrificação representa um papel importante na manutenção de níveis adequados de compostos de nitrogênio no ambiente de criação. No entanto, desequilíbrios nesse processo podem levar ao acúmulo de nitrito, que pode ser tóxico para os organismos aquáticos (Jensen 2003; Kroupová et al. 2016; Maltez et al. 2018). No presente estudo, demonstramos que concentrações até 160mg de NO_2^- -N/L não foram letais para os juvenis do linguado. A $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ estimada foi de 393mg de NO_2^- -N/L, valor muito superior ao encontrado por Bianchini et al. (1996) para a mesma espécie (30,6mg NO_2^- -N/L) criada em água salgada. No entanto, este estudo foi realizado com amostras silvestres com aproximadamente 120g, o que pode explicar a diferença entre os resultados.

A toxicidade dos compostos nitrogenados pode variar muito de acordo com o estágio de desenvolvimento ontogenético ou mesmo com o peso do organismo. Atwood et al. (2001) demonstraram que CL_{50} é dez vezes maior para tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* com cerca de 4g ($\text{CL}_{50-96\text{h}}$ - 81mg NO_2^- -N/L) do que em exemplares de aproximadamente 90g ($\text{CL}_{50-96\text{h}}$ - 8mg NO_2^- -N/L), sugerindo que peixes menores são mais tolerantes ao nitrito. Da mesma forma, a toxicidade do nitrito também aumentou com a idade em larvas do bacalhau do Pacífico *Gadus macrocephalus* (Wang et al. 2015).

Não há consenso sobre isso, pode ser variável, mas em diferentes parâmetros físicos e químicos da qualidade da água, como temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e pH, também podem ser alguns dos fatores que afetam a toxicidade do nitrito para os peixes dentro da mesma espécie (Kroupova et al. 2005). Portanto, esses fatores podem ter influenciado as diferenças entre os resultados obtidos no presente estudo em relação a estudos anteriores com *P. orbignyanus*. Os juvenis do linguado mostraram uma alta tolerância ao nitrito no presente estudo quando comparado a outras espécies de peixes marinhos. Por exemplo, pampo *Trachinotus marginatus* que apresenta $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ igual a 37,5mg NO_2^- -N/L (Costa et al. 2008), o red drum *Sciaenops ocellatus* 85mg NO_2^- -N/L (Wise e Tomasso 1989), tainha *Mugil liza* 35,9mg de NO_2^- -N/L (Sampaio et al. 2002b) e peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* 108,8mg de NO_2^- -N/L (Medeiros et al. 2016). Embora menos tolerante do que alguns peixes marinhos como *Chanos chanos* 675mg

NO₂⁻-N/L (Almendras 1987) ou enguia europeia *Anguilla anguilla* 974mg NO₂⁻-N/L criados em água salgada (Tomasso 1994).

A alta tolerância a compostos nitrogenados é uma característica desejável para espécies com potencial para aquicultura intensiva, como o linguado *P. orbignyanus*. Além de induzir potenciais mortalidades, a exposição ao nitrito pode induzir efeitos subletais em concentrações mais baixas, o que envolve diferentes alterações fisiológicas e bioquímicas nos peixes (Jensen 2003; Jia et al. 2015). No presente estudo, foram evidenciadas alterações nas defesas antioxidantes e nos níveis de dano oxidativo nos juvenis do linguado expostos ao nitrito. Uma condição de estresse oxidativo pode ser desencadeada por uma alta produção de ERO ou devido ao comprometimento do sistema de defesa antioxidante ou pela combinação de ambas as situações (Halliwell e Guteridge 2015). Estudos recentes mostraram que a exposição dos peixes ao nitrito apresentaram não apenas aumento da produção de ERO (Sun et al. 2014), mas também ERN como óxido nítrico (NO), que também tem capacidade de causar danos oxidativos (Jensen e Hansen 2011; Jensen et al. 2015) e comprometer o sistema antioxidante (Maltez et al. 2018). A avaliação da ACAP mostra uma visão geral desse sistema antioxidante nos peixes (Amado et al. 2009).

No presente estudo foi observado um comprometimento no sistema antioxidante dos juvenis de linguado expostos a 160mg de NO₂⁻-N/L. A redução na ACAP indica uma deficiência na produção de antioxidantes endógenos e / ou uma condição pró-oxidante desencadeada pelo aumento na produção de pró-oxidantes induzidas pelo acúmulo de nitrito no organismo, resultando no uso de antioxidantes (Sun et al. 2012; Jia et al. 2015). As concentrações de 80mg de NO₂⁻-N/L levaram ao aumento da atividade de GST, indicando uma resposta adaptativa contra uma condição pró-oxidante. GST são enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico do GSH a grupos eletrofílicos e estão envolvidas na detoxificação de xenobióticos e metabólitos endógenos, incluindo produtos de dano oxidativo (Blanchette et al. 2007). Um aumento na produção de agentes oxidantes nas células pode levar à ativação de fatores de transcrição redox sensíveis (Nrf2, por exemplo) e à modificação covalente de proteínas antioxidantes, resultando na ativação de defesas antioxidantes, como a GST (Hermes-Lima et al. 2015).

No presente estudo, os níveis de NPSH e PSH foram maiores em peixes expostos a 160mg de NO₂⁻-N/L. Os grupos tiol apresentaram importante capacidade antioxidante devido ao grupo funcional sulfidril que protege as células dos danos

oxidativos e podem ser encontrados em proteínas (PSH) ou moléculas de baixo peso molecular (NPSH) (Reischl et al. 2007). O conteúdo aprimorado de tióis pode estar relacionado a uma resposta antioxidante adaptativa contra uma condição pró-oxidante desencadeada pela exposição ao nitrito. Quando as defesas enzimáticas contra os radicais oxidativos são prejudicadas, antioxidantes não enzimáticos podem ser produzidos em maiores quantidades como forma de proteção contra a auto-oxidação (Sinhorin et al. 2014). A GSH é a mais predominante em NPSH na maioria das células (Dickinson e Forman 2002) que atua contra a formação de radicais livres, a homeostase do grupo tiol, a manutenção do equilíbrio das células redox e a defesa contra agentes eletrofílicos (Halliwell e Gutteridge 2015). O maior teor de NPSH pode ser explicado por uma síntese aprimorada de GSH modulada por uma superprodução de óxido nítrico (Moellering et al. 1998) associada à intoxicação por nitrito, como demonstrado anteriormente em peixes (Jensen e Hansen 2011).

O desequilíbrio entre a produção de pró-oxidantes e antioxidantes pode levar ao aumento dos níveis de dano oxidativo em diferentes macromoléculas, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídios (Halliwell e Guteridge 2015). O conteúdo de PSH é aplicado como um indicativo de oxidação de proteínas. Níveis mais altos de dano oxidativo tendem a levar a um teor reduzido de PSH (Mitton et al. 2016). No entanto, embora outros parâmetros analisados sugiram que a exposição ao nitrito induza um cenário pró-oxidante, os níveis de PSH foram maiores nas concentrações de nitrito de 160mg de NO_2^- -N/L.

Como mencionado anteriormente, isso pode ser atribuído a uma síntese desses compostos e ou ao processo chamado S-glutationilação mediado pela disponibilidade aprimorada de GSH. Nesta reação, o GSH pode modificar covalentemente os resíduos de cisteína do PSH em um processo reversível, evitando danos oxidativos irreversíveis (Jakob e Reichmann 2013; Halliwell e Gutteridge 2015). Os níveis de TBARS medem o grau de peroxidação lipídica, uma reação em cadeia iniciada por um radical hidroxila que leva à degradação oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (Halliwell e Guteridge 2015). Embora as mudanças nas respostas antioxidantes observadas em peixes expostos a 80 e 160mg de NO_2^- -N/L indicassem uma condição pró-oxidante, os níveis de TBARS não mostraram diferença em relação ao grupo controle. Esse resultado indica que nessas concentrações o sistema antioxidante era eficiente na manutenção dos níveis basais de dano oxidativo. Diferentemente, na maior concentração (320mg NO_2^- -N/L), os peixes apresentaram aumento nos níveis de dano lipídico, demonstrando a

falha do sistema antioxidante em conter a ação dos radicais livres ou remover os produtos do dano oxidativo. Jia et al. (2015) também relataram um aumento nos níveis de TBARS em brânquias de juvenis de *Scophthalmus maximus* após 96h de exposição ao nitrito. Sun et al. (2014) demonstraram um aumento significativo nos níveis de TBARS no fígado para *Megalobrama amblycephala* após 48 e 72h de exposição a 15mg de concentração de NO_2^- -N/L. Maltez et al. (2018) também demonstraram alterações nas respostas aos danos antioxidantes e oxidativos nas brânquias, fígado e músculo do linguado com cerca de 300g em 10 dias de exposição a concentrações entre 5,72 e 15,27mg de NO_2^- -N/L. No entanto, vale ressaltar que as alterações descritas por esses autores, embora semelhantes, foram obtidas em concentrações mais baixas que neste estudo.

Na aquicultura, o estresse oxidativo induzido nos peixes por inadequação dos níveis de nitrito no ambiente pode ser um problema para a produção, pois pode comprometer o processo fisiológico e os níveis de energia, crescimento e sobrevivência (Livingstone 2003; Valavanidis et al. 2006), além de alterar a qualidade do músculo devido ao processo de degradação oxidativa (Zhang et al. 2016). A exposição a níveis indesejáveis de nitrito também pode resultar em alterações histopatológicas nos tecidos dos órgãos-alvo como brânquias e fígado (Medeiros et al. 2016, Park et al. 2007). As brânquias são altamente suscetíveis a danos causados por substâncias tóxicas devido ao seu contato constante com a água e o fígado está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo a detoxificação de xenobióticos (Machado 1999; Bernet et al. 1999). No entanto, no presente estudo, nenhuma alteração histológica foi observada nesses órgãos do linguado, mesmo quando expostos a maior concentração de nitrito. Maltez et al. (2017), no estudo da exposição a compostos nitrogenados em juvenis do linguado *P. orbignyanus*, também observaram que, apesar das alterações nos níveis de estresse oxidativo nos tecidos, não encontraram danos no nível histopatológico.

6. Conclusões

Em conclusão, as concentrações de nitrito até 160mg de NO_2^- -N/L não foram letais e o CL_{50} variou de 427,84 a 393,09mg de NO_2^- -N/L por 24 e 96h, respectivamente, para juvenis do linguado *P. orbignyanus*. A exposição a concentrações de 80mg NO_2^- -N/L resultou em alterações no sistema de defesa antioxidante, com aumento do dano oxidativo lipídico na concentração de 320mg NO_2^- -N/L. Portanto,

recomenda-se que a concentração de nitrito nos sistemas de produção não exceda 40 mg de NO_2^- -N/L, a fim de evitar o estresse oxidativo em juvenis do linguado *P. orbignyianus*.

7. Referências Bibliográficas

- Almendras JME (1987) Acute nitrite toxicity and methemoglobinemia in juvenile milkfish (*Chanos Chanos Forsskal*). *Aquaculture*, 61: 33-40.
- Amado LL, Longaray Garcia M, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ribas Ferreira JL, Yunes JS, Monserrat JM (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407:2115–2123.
- Atwood HL, Fontenot QC, Tomasso JR, Isely JJ (2001) Toxicity of nitrite to Nile tilapia: effect of fish size and environmental chloride. *N Am J Aquacult*, 63(1): 49-51.
- Avilez IM, Aguiar LH, Altran AE, Moraes G (2004) Acute toxicity of nitrite to matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869), (Teleostei-Characidae). *Ciência Rural*, 36(6): 1753-1756.
- Baldisserotto B, Gomes LC (2010) Espécies nativas para a piscicultura no Brasil, (2 ed). Editora da UFSM, Santa Maria.
- Baldisserotto B (2013). Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura, terceira ed. Editora da UFSM, Santa Maria.
- Baldisserotto B, Martos-Sitcha JA, Menezes CC, Toni C, Prati RL, Garcia LDO, Martínez-Rodríguez G (2014) The effects of ammonia and water hardness on the hormonal, osmoregulatory and metabolic responses of the freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquatic Toxicology*, 152: 341-352.
- Barton BA (2002) Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3): 517-525.
- Bendschneider K, Robinson RJ (1952) A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J Mar Res* 11:87–96

- Benli AÇK, Köksal G, Özkul A (2008) Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere* 72, 1355-1358.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-34.
- Bianchini A, Wasielesky W, Miranda KC (1996) Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 56: 453-459.
- Bianchini, A, Robaldo RB, Sampaio LA (2010) Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*). In: Baldisserotto B, Gomes L. C. (eds) *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*, 2nd ed. Editora UFSM, Santa Maria, 559-587 pp.
- Blanchette B, Feng X, Singh BR (2007) Marine glutathione S-transferases. *Mar Biotechnol* 9:513–542.
- Boyd CE, Tucker CS (2012) *Pond aquaculture water quality management*. Springer Science and Business Média.
- Brasil, Ministério da Pesca e da Aquicultura. 1º Anuário brasileiro da pesca e Aquicultura. Florianópolis: Associação Cultura e Educacional Brasil. 2014.
- Cavalli RO, Domingues EC, Hamilton S (2011) Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. *R Bras Zootec* 40 (supl. especial).
- Cerqueira VR, Carvalho CVC, Sanches EG, Passini G, Baloi M, Rodrigues RV (2017) Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. *Rev bras reprod anim supl* 41: 94-102.
- Cousseau MB, Perrota RG (1998) *Peces marinos de Argentina. Biología, distribución, pesca*. INIDEP, Mar del Plata.
- Campos, B.R., Miranda Filho, K.C., D'Incao, F., Poersch, L. and Wasielesky, W. 2012. Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille,1817) (Crustacea:Decapoda). *Atlântica, Rio Grande*, 34(1): 75-81.
- Costa LDF, Miranda Filho KC, Severo MP, Sampaio LA (2008) Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. *Aquaculture* 285(1-4): 270-272.
- Da Rocha AM, de Freitas DS, Burns M, Vieira JP, de La Torre FR, Monserrat JM (2009) Seasonal and organ variations in antioxidant capacity, detoxifying

- competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from Southern Brazil. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150:512–520.
- Dong X, Zhang X, Qin J, Zong S (2013) Acute ammonia toxicity and gill morphological changes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in normal versus supersaturated oxygen. *Aquac Res* 44:1752-1759.
- Díaz de Astarloa JM (2002) A review of the flatfish fisheries of the South Atlantic Ocean. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 37(2): 113-125.
- Dickinson DA, Forman HJ (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019–1026.
- Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st edn. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Ebeling JM, Timmons MB (2012) Recirculating aquaculture systems. *Aquaculture production systems*, 245-277.
- FAO (2018) Aquaculture Department The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 218 pp.
- Figueiredo JD, Menezes NA (2000) Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: Teleostei; Museu de Zoologia, Univ. de São Paulo.
- Gomułka P, Żarski D, Kupren K, Krejszeff S, Targońska K, Kucharczyk D (2014). Acute ammonia toxicity during early ontogeny of ide *Leuciscus idus* (Cyprinidae). *Aquaculture International*, 22(1): 225-233.
- Grosell M e Jensen FB (2000) Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology*, 50: 97-107.
- Gross A, Boyd CE, Wood CW (2000) Nitrogen budget and transformations in channel catfish ponds. *Aquaculture Engineering*, 24: 113-132.
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 77:398–405.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139.
- Hermes-Lima M, Moreira DC, Rivera-Ingraham GA, GiraudBilloud M, Genaro-Mattos TC, Campos ÉG (2015) Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radic Biol Med* 89:1122–1143.

- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Antioxidant defenses endogenous and diet derived. *Free radicals in biology and medicine*, 111.
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hamilin HJ (2006) Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture*, 253: 688-693.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV (1977) Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol* 11(7): 714-719.
- Hansen MN, Jensen FB (2010) Nitric oxide metabolites in goldfish under normoxic and hypoxic conditions. *Journal of Experimental Biology*, 213: 3593-3602.
- Hurvitz A, Bercovier H, Rijn J (1997) Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*, 7: 45-7 53.
- Ip YK, Chew SF (2010) Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: A review. *Front Physiol* 1:134.
- Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. and Schreck, C.B. 2011. *Fish stress and health in aquaculture* (Vol. 62). Cambridge University Press.
- Jakob U, Reichmann D (2013) *Oxidative stress and redox regulation*. Springer, 25 Dordrecht.
- Jensen FB (2003) Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 135(1): 9-24.
- Jensen FB, Hansen MN (2011) Differential uptake and metabolism of nitrite in normoxic and hypoxic goldfish. *Aquatic Toxicology*, 101(2): 318-325.
- Jensen FB, Gerber L, Hansen MN Madsen SS (2015) Metabolic fates and effects of nitrite in brown trout under normoxic and hypoxic conditions: blood and tissue nitrite metabolism and interactions with branchial NOS, Na⁺/K⁺-ATPase and hsp70 expression. *Journal of Experimental Biology*, 218 (13): 2015-2022.
- Jia R, Han C, Lei JL, Liu BL, Huang B, Huo HH, Yin ST (2015) Effects of nitrite exposure on hematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquatic Toxicology*, 169: 1-9.
- Klinger D, Naylor R (2012) Searching for solutions in aquaculture: charting a sustainable course. *Environment and Resources*, 37: 247-276.

- Kroupova H, Machova J, Svobodova Z (2005) Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina-Praha*, 50(11): 461.
- Kroupova H, Máchová J, Piačková V, Flajšhans M, Svobodova Z, Poleszczuk G (2006) Nitrite intoxication of common carp (*Cyprinus carpio L.*) at different water temperatures. *Acta Veterinaria Brno*, 75(4): 561-569.
- Kroupová HK, Valentová O, Svobodová Z, Šauer P, Máchová, J (2016) Toxic effects of nitrite on freshwater organisms: a review. *Rev Aquacult* 0:1-18.
- Lema T, Oliveira MFT, Lucena CAS (1980) Levantamento preliminar dos Pleuronectiformes do extremo sul do Brasil ao Rio de la Plata. *Iheringia*, 56: 25-52.
- Liebel S, Tomotake MEM, Ribeiro CAO (2013) Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8, 09-15.
- Livingstone DR (2003) Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Med Vet* 154:427–430
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1): 13-30.
- Machado, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina*, v. 1, n. 1, p. 63-76, out. 1999.
- Maltez LC, Stringhetta GR, Enamorado AD, Okamoto MH, Romano LR, Monserrat JM, Sampaio LA, Garcia L (2017) Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiol Biochem* 43: 1747.
- Maltez, L.C., Barbas, L.A.L., Nitz, L.F., Pellegrin, L., Okamoto, M.H., Sampaio, L.A. and Garcia, L. 2018. Oxidative stress and antioxidant responses in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* exposed to sublethal levels of nitrite. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(5): 1349-1362.
- Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A (2005) Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and fisheries*, 15(1-2): 75-88.
- Medeiros RS, Lopez BA, Sampaio LA, Romano LA, Rodrigues RV (2016) Ammonia and nitrite toxicity to false clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture international*, 24(4): 985-993.
- Mitton FM, Ferreira JLR, Gonzalez M, Miglioranza KS, Monserrat JM (2016) Antioxidant responses in soybean and alfalfa plants grown in DDTs

- contaminated soils: useful variables for selecting plants for soil phytoremediation? *Pestic Biochem Physiol* 130:17–21.
- Moellering D, McAndrew J, Patel RP, Cornwell T, Lincoln T, Cao X, Messina JL, Forman HJ, Jo H, Darley-Usmar VM (1998) Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of γ -glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys* 358:74–82.
- Monserat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CMG, Pinho GLL, Bianchini A (2007) Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(1-2): 221-234.
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MV (2016) *Fishes of the World*. John Wiley and Sons.
- Oakes KD, Kraak VD (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations. *Aquat Toxicol* 63:447–463.
- Ostrensky A, Wasielesky Jr W (1995) Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis Pérez-Farfante*, 1967. *Aquaculture*, 132(3-4): 339-347.
- Park IS, Lee J, Hur JW, Song YC, Na HC, Noh CH (2007) Acute Toxicity and Sublethal Effects of Nitrite on Selected Hematological Parameters and Tissues in Dark-banded Rockfish, *Sebastes inermis*. *J. World Aquacul. Soc.* 38, 188-26199.
- Queiroz JF, Boeira RC (2007) Boas práticas de manejo (BPMs) para reduzir o acúmulo de amônia nos viveiros de aquicultura. Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico.
- Randall DJ, Tsui TK (2002) Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* 45 (1-28 12):17-23.
- Reiser S, Schroeder JP, Wuertz S, Kloas W, Hanel R (2010) Histological and physiological alterations in juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.) exposed to sublethal concentrations of ozone-produced oxidants in ozonated seawater. *Aquaculture* 307, 157-164.
- Reischl E, Dafre AL, Franco JL, Wilhelm Filho D (2007) Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146(2): 22-53.

- Robaldo, R.B., Rodrigues, R.V., Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., 2012. Processing yield of wild-caught and indoor-reared Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. J. Appl. Ichthyol. 28, 815-817.
- Rodrigues RV, Schwarz MH, Delbos BC (2007) Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture, 271(1-4): 553-557.
- Rodrigues RV, Romano LA, Schwarz MH, Delbos B, Sampaio LA (2014) Acute tolerance and histopathological effects of ammonia on juvenile maroon clownfish *Premnas biaculeatus* (Block 1790). Aquac. Res. 45, 1133-1139.
- Rodrigues ASL, Gnocchi KG, Delunardo FAC, Medeiros LCC, Merçon J, Gomes LC (2018) Acute toxicity of nitrite in fat snook (*Centropomus parallelus*). Marine and Freshwater Behavior and Physiology.
- Sampaio LA, Bianchini A (2002) Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 269(2): 187-196.
- Sampaio LA, Wasielesky WB, Miranda Filho K (2002b) Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. Bull Environ Contam Toxicol 68(5): 668-674.
- Sampaio LA, Pissetti TL, Morena M (2006) Toxicidade aguda do nitrito em larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae).
- Sampaio LA, Robaldo RB, Bianchini A (2008) Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). Aquaculture Research, 39(7): 712-717.
- Saoud P, Naamani S, Ghanawi J, Nasser N (2014) Effects of acute and chronic nitrite exposure on rabbitfish *Siganus rivulatus* growth, hematological parameters, and gill histology. J. Aquac. Res. Dev. 5, 263-271.
- Schram E, Roques JA, Abbink W, Spanings T, De Vries P, Bierman S, Flik G, Van de Vis H (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.
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein-sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 25:192-205.

- Simonato JD, Guedes CL, Martinez CB (2008) Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotox. Environ. Saf.* 69, 112-120.
- Sinhorin VDG, Sinhorin AP, dos Santos Teixeira JM, Miléski KML, Hansen PC, Moreira PSA, Kawashita NH, Baviera AM, Loro VL (2014) Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicol Environ Saf* 106:181–187.
- Stoliar OB, Lushchak VI (2012) Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. In: *Oxidative Stress-Environmental Induction and Dietary Antioxidants*. InTech.
- Sun S, Ge X, Zhu J, Xuan F, Jiang X (2014) Identification and mRNA expression of antioxidant enzyme genes associated with the oxidative stress response in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in response to acute nitrite exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 159:69–77.
- Sun H, Li J, Tang L, Yang Z (2012) Responses of crucian carp *Carassius auratus* to long-term exposure to nitrite and low dissolved oxygen levels. *Biochem Syst Ecol* 44:224–232.
- Svobodova Z, Machova J, Poleszczuk G, Hůda J, Hamáčková J, Kroupova H (2005) Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *Acta Veterinaria Brno*, 74(1): 129-137.
- Thangam Y (2014) Effect of acute and sublethal toxicity of nitrite to freshwater fish *Cirrhinus Mrigala*. *Int. J. Sci. Eng. Res.* 5, 789-795.
- Tomasso, J.R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, 2(4): 291-314.
- UNESCO (1983) *Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12*. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:178–189.
- Wang YB, Wenju Z, Weifen L, Zirong X (2006) Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32: 49-54.

- Wang W, Wang H, Yu C, Jiang Z (2015) Acute toxicity of ammonia and nitrite to different ages of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) larvae. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 27(4): 147-155.
- Wasielisky W, Bianchini A, Santos MHS, Poersch LH (1997) Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *Jornal World Aquaculture. Soc.* 28: 202-204.
- Wasielisky W, Bianchini A, Miranda K (1998) Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marítimo*. 17(A): 43-48.
- Wendelaar Bonga SE (2011) Hormonal responses to stress: hormone response to stress. *Encyclopedia of Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, 1515-1523.
- Wise DJ, Tomasso JR (1989) Acute Toxicity of Nitrite to Red Drum *Sciaenops ocellatus*: Effect of Salinity. *J World Aquacult Soc* 20(4) :193-198.
- Wuertz S, Schulze SGE, Eberhardt U, Schulz C, Schroeder JP (2013) Acute and chronic nitrite toxicity in juvenile pikeperch (*Sander lucioperca*) and its compensation by chloride. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 157(4): 352-360.
- Zhang L, Feng L, Jiang WD, Liu Y, Jiang J, Li SH, Tang L, Kuang SY, Zhou XQ (2016) The impaired flesh quality by iron deficiency and excess is associated with increasing oxidative damage and decreasing antioxidant capacity in the muscle of young grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquac Nutr* 22:191-201.