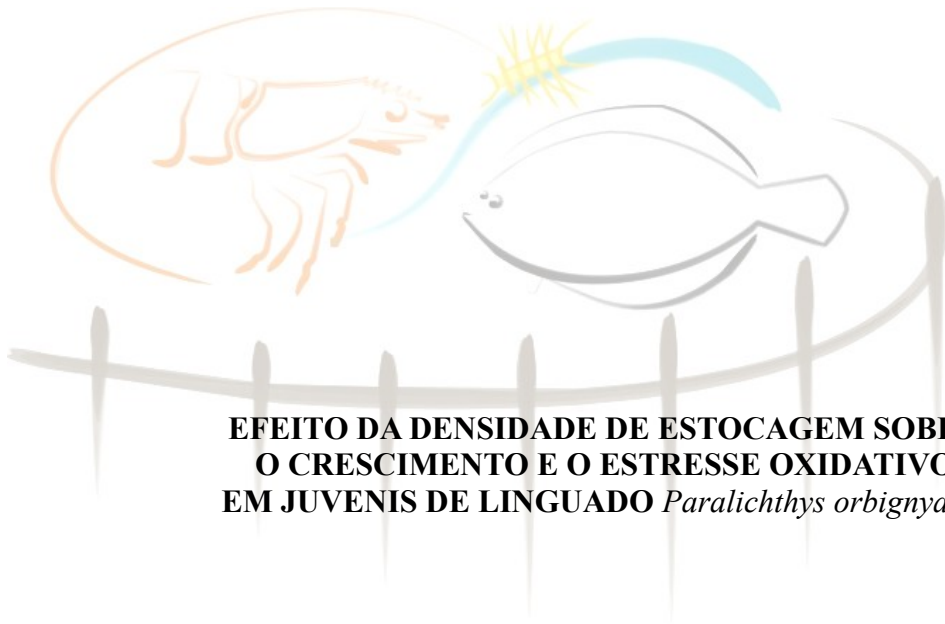




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITO DA DENSIDADE DE ESTOCAGEM SOBRE
O CRESCIMENTO E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM JUVENIS DE LINGUADO *Paralichthys orbignyanus***

Joel Fitzgerald Linares Cordova

FURG
RIO GRANDE - RS
2019

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

**EFEITO DA DENSIDADE DE ESTOCAGEM SOBRE
O CRESCIMENTO E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM JUVENIS DE LINGUADO *Paralichthys orbignyanus***

JOEL FITZGERALD LINARES CORDOVA

Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio
Co-Orientadora: Dra Patrícia Baptista Ramos

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

RIO GRANDE - RS

MARÇO 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao melhor avô do mundo “Papá Mane”, aos meus pais (Luz e Joel) e à minha família em geral, amigos e colegas que com seu apoio contribuíram para realização desse sonho.

*“Por pior que a vida pareça, sempre existe algo
que você possa fazer e ser bem-sucedido.
Enquanto há vida, há esperança”.*

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus pela minha vida, sabedoria e oportunidade de fazer esse mestrado tão longe de casa.

A CAPES pela bolsa de mestrado e assim alcançar os resultados nesse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Luís André Sampaio pela sua orientação, paciência, dedicação fornecida durante o desenvolvimento do experimento e escrita.

Agradeço à Dra. Gionara Tauchen pelo apoio incondicional desde a minha chegada ao Rio Grande. Obrigado Gio!

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Aquicultura da Estação Marinha de Aquicultura, pela oportunidade dada e enorme aprendizagem adquirida durante minha passagem pelo programa.

Aos amigos que fiz dentro do programa: Thiago, Luquinhas, Diego, Ivanildo, Daniel, Lidia, Nathalia, Rafita, Ednara, Flávia, Ane, Mario, Idelette, Wellica, Nachito, Hellyjunior, Rodrigo, Missileny, Ana Paula, Yasmin, Grécica, Marquitos, Cleber, Manuel, Thamyris e todos em geral que me acolheram muito bem.

Um agradecimento sincero para as pessoas que me apoiaram durante o desenvolvimento do experimento (análise de qualidade de água, biometria e coleta de órgãos): prof. Marcelo, Luquinhas, Diego, Rafita, Thiago, Ane, Daniel, Lídia, Ednara.

Aos amigos do alojamento da EMA por todo este tempo de convivência e com os quais passamos muitos momentos divertidos.

A Gheraldine Ynga “Gherita” e Diana Villalobos “Dianacha”, amigos que mesmo desde Perú mostraram sempre preocupação com meu bem-estar e me apoiaram desde o início dessa caminhada.

Muito obrigado a TODOS.

MUITO OBRIGADO, BRASIL.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| DEDICATÓRIA..... | ii |
| | i |
| AGRADECIMENTOS | iv |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 8 |
| OBJETIVO GERAL..... | 15 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 15 |
| HIPÓTESES..... | 15 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 15 |
| RESULTADOS..... | 21 |
| DISCUSSÃO..... | 29 |
| CONCLUSÕES | 34 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 34 |
| REFERÊNCIAS | 35 |

RESUMO

A densidade de estocagem é considerada uma variável importante na aquicultura, já que afeta o crescimento e o bem-estar dos animais. O linguado *Paralichthys orbignyanus* é uma espécie de alto valor comercial, com potencial para piscicultura marinha. Seu hábito demersal faz com que sua densidade de estocagem seja avaliada em função da área e não do volume do tanque, conforme a maioria das espécies de peixes. Dado isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes densidades de estocagem sobre o crescimento e o estresse oxidativo em juvenis de linguado, considerando o percentual de área ocupada (PCA) pelos peixes. Juvenis de linguado (1,58 g) foram distribuídos em 16 tanques de 50 L conectados em quatro sistemas de recirculação de água (RAS) e foram testadas quatro densidades (com quatro repetições cada): 50% PCA (82 peixes / tanque), 100% PCA (164 peixes / tanque), 150% PCA (246 peixes / tanque) e 200% PCA (328 peixes / tanque) durante 45 dias. Foram feitas biometrias no início e final do experimento (30 indivíduos por tanque). Amostras de cérebro, brânquias, fígado e músculo (12 peixes por tanque) também foram coletadas no final do experimento para as análises de estresse oxidativo. Nesse estudo, foi demonstrado o efeito negativo do incremento da densidade de estocagem sobre o crescimento e o sistema antioxidante dos linguados. O peso final no tratamento com 200% PCA foi significativamente menor ($P < 0,05$) do que nos outros grupos, enquanto os juvenis de linguado criados em 50% PCA atingiram $8,36 \pm 0,41$ g, aqueles mantidos em 200% PCA cresceram apenas até $6,13 \pm 0,2$ g. Ao final do experimento, a taxa de crescimento específico (TCE) e a conversão alimentar (CA) também foram prejudicadas pela alta densidade populacional. O aumento da densidade de estocagem induziu alterações que comprometeram o sistema antioxidante (atividade reduzida de ACAP e GST) e aumentaram o dano oxidativo nos lipídios. Aumentos na atividade de GST e no conteúdo de PSH também foram demonstrados. Em conclusão, a densidade de estocagem de juvenis de linguados pode ser de até 100% PCA sem prejuízo do crescimento e do sistema de defesa antioxidante

Palavras-chave linguado brasileiro, estresse, bem-estar

ABSTRACT

Stocking density is considered an important variable in aquaculture as it affects fish growth and welfare. The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* is a species with a high commercial value and potential for marine fish culture. Given the demersal behavior of flounder, stocking density for these fish is to be studied considering area occupancy. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of different stocking densities on growth and oxidative stress in juvenile flounder, considering the percentage of covered area (PCA) by fish. Juvenile Brazilian flounder (1.58 g) were distributed in 16 tanks (50 L each), connected to recirculating aquaculture systems and exposed to four stocking densities: 50, 100, 150, and 200% PCA for 45 days, with four replicates each one. Fish were measured and weighed at the beginning and end of the experiment. Samples of brain, gills, liver and muscle were collected at the end of the experiment for oxidative stress analyzes. Growth performance was hampered by increasing stocking density. The final weight in the 200% PCA treatment was significantly lower ($P < 0.05$) than in other groups, flounder reared at 50% PCA reached 8.36 ± 0.41 g, while those reared at 200% PCA grew up to 6.13 ± 0.2 g. Similarly, increasing stocking density induced alterations which compromised the antioxidant system (reduced ACAP and GST activity) and enhanced oxidative damage in lipids. Increases in GST activity and PSH contents were also demonstrated. In conclusion, when the stocking density reached 150% PCA, growth performance and oxidative stress responses were adversely affected. Therefore, in order to enhance growth and minimize free radical production that could damage the antioxidant defense system, stocking density of juvenile Brazilian flounder should be limited to 100% PCA.

Keywords: Brazilian flounder, crowding, stress, welfare

1. INTRODUÇÃO

1.1. LINGUADO *Paralichthys orbignyanus*

O linguado *Paralichthys orbignyanus* é um peixe demersal que pertence à Ordem Pleuronectiforme e a Família Paralichthyidae, na qual se caracteriza por sofrer metamorfose durante o estágio larval, virando de uma larva pelágica e com simetria bilateral a uma com corpo assimétrico e comprimido dorso-ventralmente, além da localização dos dois olhos no mesmo lado da cabeça (Nelson, 2006).

Está distribuído a partir do estado do Rio de Janeiro, no Brasil, até Mar del Plata, na Argentina (Figueiredo e Menezes, 2000), constituindo um recurso pesqueiro importante (Millner et al., 2005) devido a sua excelente qualidade da carne que provoca um elevado valor de mercado, além de apresentar um alto rendimento de filetagem (Robaldo et al., 2012). Além disso, pode atingir 1 m de comprimento total e pesar cerca de 10 kg (Bianchini et al., 2010). O linguado apresenta uma ampla tolerância aos parâmetros ambientais durante a criação, como pH entre 5,2 a 8,0 (Wasiolesky et al., 1997), a temperatura entre 20 a 26°C (Okamoto e Sampaio, 2012; Garcia et al., 2015), a salinidade entre 11 a 30‰ (Sampaio e Bianchini, 2002) e compostos nitrogenados entre 0,12 a 0,57 mg NH₃-NL⁻¹ (Maltez et al. 2017). Também é resistente a procedimentos de manejo como fotoperíodo entre 18 a 24 horas de luz (Louzada, 2004), incluindo anestesia, transporte e captura (Bolasina, 2011; Benovit et al., 2012). Além disso, sua larvicultura tem sido realizada com sucesso em condições de laboratório (Sampaio et al. 2007, 2008). Em função das características citadas, o linguado é uma das espécies consideradas promissoras para o desenvolvimento da piscicultura marinha no Brasil razão pelo qual vem sendo estudado em escala experimental no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha da FURG para assim obter as informações necessárias para que o processo de criação do linguado se torne uma alternativa viável comercialmente.

O elevado valor comercial de algumas espécies de linguado motivou a criação desses peixes, que estão entre as principais espécies marinhas produzidas em cativeiro. Dados da FAO (2016) destacam a produção do linguado japonês *Paralichthys olivaceus*, que atingiu em 2016 pouco mais de 43.900 t.

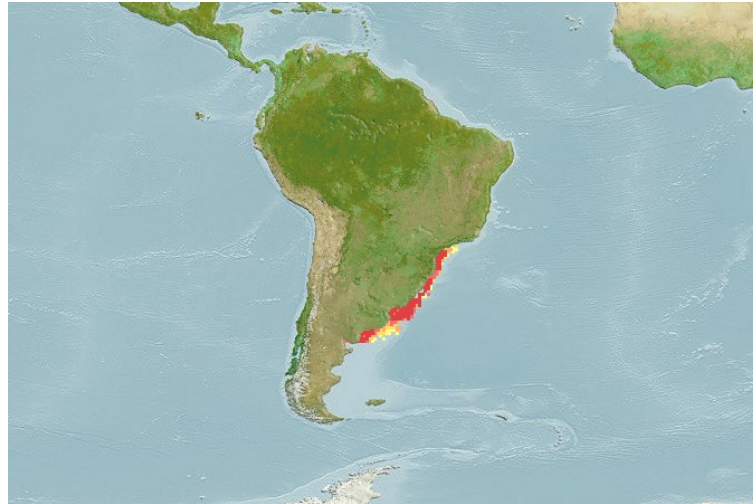


Figura 1. Distribuição geográfica e probabilidade relativa de ocorrência do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Fonte: FishBase).

1.2. DENSIDADE DE ESTOCAGEM

A densidade e estocagem é considerada uma variável importante na aquicultura, já que tem influência no desempenho de crescimento, consumo de alimentos (Wang et al., 2018; Guo et al., 2017; McKenzie et al., 2012; Sanchez et al., 2011), resposta imunológica e fisiológica (Liu et al., 2016; Andrade et al., 2015) e variação de tamanho (Zeng et al., 2010; Irwin et al. 1999), levando assim a problemas de saúde e resultando em taxas de crescimento reduzidas devido ao comportamento de peixes relacionados a interações sociais (hierarquia, territorialismo) influenciados por densidades inadequadas na produção aquícola (Bolasina et al., 2006; Dou et al., 2004; Irwin et al., 1999). Por outro lado, o bem-estar dos peixes está recebendo uma atenção cada vez maior, sendo que, medidas estão sendo tomadas na regulamentação das práticas de gestão, incluindo a densidade animal (Turnbull et al., 2005; Nieuwegiessen et al., 2008).

A determinação da densidade de estocagem ótima tem sido referenciada como a maior quantidade de organismos que podem ser eficientemente produzidos em um espaço, otimizando assim os benefícios econômicos e sua viabilidade no desenvolvimento da produção comercial (Biswas et al., 2013; Castillo Vargas et al., 2012).

Diferentes estudos relacionados a densidades de estocagem elevadas em um pequeno espaço pode gerar diminuição no crescimento e no desempenho dos peixes (Vijayan et al., 1990; Jobling, 1994; Bolasina et al., 2006; Merino et al., 2007; Arbeláez-

Rojas, 2009) devido a competição por alimento (Schwedler e Johnson, 2000; Kestemont e Baras, 2001), práticas inapropriadas de manejo alimentar (Kestemont e Baras, 2001). Finalmente, outro fator que pode causar a diminuição de desempenho em peixes submetidos a altas densidades de estocagem é o estresse (Schwedler e Johnson, 2000; Sanches, 2013). Em contraste, diversos autores relataram que o aumento das densidades de estocagem causa uma melhora nos índices de conversão alimentar, diminuição na heterogeneidade entre os peixes, e aumento da biomassa total (Salaro et al., 2003; Ayroza et al., 2011); conseqüentemente, determinam um maior retorno sobre os investimentos em estruturas e equipamentos (Hengsawat et al., 1997).

Em quanto o efeito da densidade de estocagem no crescimento em diferentes espécies de linguado, existem alguns estudos como: *Paralichthys dentatus*, a medida que os peixes crescem a densidade de estocagem deve ser reduzida de 200% para 100% de cobertura de área (PCA) para não prejudicar o crescimento (King et al., 1998). Assim também, para *Scophthalmus maximus* foi relatado que a densidades maiores as taxas de crescimento são mais lentas devido ao aumento da concorrência por alimento (Irwin et al., 1999). Fairchild e Howell (2001) indicam que juvenis de *Pseudopleuronectes americanus* poderiam ser criados até 200% e possivelmente 300% PCF sem prejudicar o crescimento, mas os peixes ficam mais estressados e com maior risco de adquirir doenças. Merino et al. (2007) menciona que juvenis de *Paralichthys californicus* criados a 100% PCA cresceram mais do que aqueles criados a 200% e 300% PCA. Finalmente, de acordo com o que foi descrito acima, a densidade de estocagem seguro para a criação de linguados é de 100 a 200% PCA. Desta forma, a identificação da ótima densidade de estocagem para uma espécie é um fator crítico no delineamento ou na definição de um eficiente sistema de produção.

1.3. ESTRESSE

O estresse é a cascata fisiológica que influencia o sucesso produtivo de uma criação, já que os peixes sob estresse enfrentam e sofrem alterações fisiológicas, o que pode causar uma redução na habilidade de manter ou restabelecer a homeostase (Shreck, 2010).

Moberg (1985), dividiu a resposta ao estresse em três fases: primeiro ocorre o desequilíbrio na homeostase; em seguida, o organismo reage em resposta ao estresse e, finalmente, ocorrem as conseqüências fisiológicas e comportamentais, as quais são

dependentes da condição biológica do peixe. Cada fase compreende diferentes efeitos no organismo do peixe, as quais se iniciam no sistema nervoso e são mediadas pelo sistema neuroendócrino e geralmente direcionadas à mobilização de energia para o organismo escapar ou combater o estressor (Pickering, 1981).

A reação aos estressores nos peixes foram divididas em dois momentos (Silva et al. 2010): primeiro, os efeitos que ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático, segundo o desencadeamento de diversas respostas fisiológicas compensatórias e adaptativas, visando a superação das ameaças. Asimismo, Barton (2000) classificou a origem dos agentes de estresse em peixes em três tipos: 1) de natureza física, como o transporte, densidade de estocagem inadequado e o manejo; 2) de natureza química, como os contaminantes, o baixo teor de oxigênio, oscilações no pH e concentração elevada de amônia e nitrito, além dos fatores decorrentes da degradação da matéria orgânica que conseqüentemente resultam em poluentes orgânicos e inorgânicos e 3) os percebidos pelos animais, como a presença de predadores, de coespecíficos dominantes ou coespecíficos não familiares, também denominado de estresse social.

Assim, uma densidade de estocagem inadequada gera um estado de estresse em peixes subordinados que provavelmente envolve o estado de medo e inibe a expressão do comportamento natural (Chandroo et al., 2004). Barton 2002, menciona que os peixes não conseguem se restabelecer num estresse intenso ou prolongado, podendo ocasionar conseqüências negativas para o seu estado de saúde. Exposições prologadas a agentes estressores, que inicialmente não parecem problemáticos, podem se acumular havendo o risco de se tornarem letais para os indivíduos (Barton e Iwama, 1991; Conte, 2004). A distinção entre o estresse agudo e o estresse crônico é de extrema importância já que o primeiro geralmente ocorre durante o manejo dos animais ou pela ocorrência de contatos repentinos com situações estressantes que levem os peixes a um estresse rápido. Este, geralmente cessa com o final do estímulo e os peixes se reestabelecem. O estresse crônico, manifesta-se em condições as quais os peixes mantêm-se estressados permanentes e, como conseqüência, geralmente há queda no rendimento produtivo e/ou diminuição da resistência imunológica podendo inclusive gerar doenças e mortalidade (Sanches, 2013).

As respostas ao estresse podem ser apresentadas em: resposta primária, que envolve a liberação de catecolaminas e corticosteróides no sistema circulatório (Barton,

2002). As respostas secundárias são mudanças na gama de fatores bioquímicos, hematológicos e imunológicos (Frisch e Anderson, 2005). As respostas terciárias afetam o crescimento, a taxa metabólica, a resistência a doenças, a capacidade reprodutiva e sobrevivência (Barton e Iwama, 1991; Barton, 2002). Finalmente, para uma produção rentável é importante encontrar um limite entre o interesse econômico e a incidência de alterações fisiológicas (Bjornsson et al., 2012; Herrera et al., 2009).

1.3.1. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, conduzindo à ocorrência de danos celulares oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2015). O estresse oxidativo ocorrerá devido a: aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs), deficiência no sistema antioxidante ou a uma insuficiente capacidade de reparação aos danos oxidativos. Os danos causados por EROs incluem alterações de macromoléculas celulares como membranas lipídicas, DNA e/ou proteínas (Sies, 2015; Liang et al., 2016). Estas modificações podem alterar as funções celulares devido a mudanças no pH ou concentração de cálcio intracelulares, podendo levar a morte celular (Swan et al., 1991; Dorval et al., 2005; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Os peixes, como todos os organismos aeróbios, desenvolveram evolutivamente um complexo sistema antioxidante composto de diversas defesas não enzimáticas e enzimáticas que atuam impedindo a formação e ação das espécies reativas de oxigênio (ERO), ou favorecendo o reparo e a reconstituição de moléculas que sofreram danos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2015). O processo de metabolização de xenobióticos é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio, que correspondem aos produtos da redução do oxigênio molecular, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As espécies reativas de oxigênio passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes antioxidantes. Em qualquer uma dessas situações predomina EROS no organismo, o que é denominado estresse oxidativo.

Essa situação pode derivar tanto de fatores internos como de fatores externos (Stegeman et al., 1992). Para combater essas espécies reativas de oxigênio existe um

sistema de defesa antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx), todas elas abundantes nos tecidos de peixes (Van der Oost et al., 2003; Vasconcelos et al., 2007; Wu et al., 2015).

A catalase descrita em 1901 por Loew (Frugoli et al., 1996), é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. A CAT é a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o H_2O_2 formado nas células sob condições de estresse (Mallick e Mohn, 2000). Ocorrem primariamente nos peroxissomos e a proliferação peroxissômica é a principal causa para a elevação da atividade catalásica nos tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A glutathione peroxidase (GPx), é a principal peroxidase de peixes, uma enzima citosólica tetramérica, dependente de selênio, que emprega a glutathione reduzida (GSH) como co-fator. A GPx catalisa o metabolismo de um grande número de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e do H_2O_2 para água, envolvendo a oxidação concomitante da GSH para sua forma oxidada (GSSG). A GPx pode estar localizada no citosol, bem como na matriz mitocondrial, e divide com a catalase a habilidade para detoxificar o H_2O_2 (Martinez, 2006).

A enzima glutathione-S-transferase (GST) desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo agroquímicos. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutathione. Assim, animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a xenobióticos os quais sofrem detoxificação mediada pela glutathione na sua forma reduzida, catalisada pela enzima GST (Zhou et al., 2009).

A GSH está envolvida em várias funções fisiológicas: mantém os grupos SH das proteínas no estado reduzido, participa no transporte de aminoácidos e detoxificação de toxinas (Ventura-Lima et al., 2009), atua enzimaticamente degradando peróxidos endógenos, forma moléculas bioativas e atua como coenzima em várias reações enzimáticas (Stamler e Slivka, 1996). A GSH participa ainda na decomposição do H_2O_2 , potencialmente tóxico, que é convertido em H_2O em reação catalisada pela GPx, às custas da glutathione reduzida; a glutathione oxidada resultante é reciclada à forma reduzida pela glutathione reductase e NADPH (Gul et al., 2000). O NADPH é regenerado

pela via das pentoses fosfato, em reação catalisada pela glicose 6 fosfato desidrogenase, a qual é particularmente importante nos eritrócitos. Dessa forma, este processo de reciclagem e a manutenção de níveis adequados de GSH podem prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (Stamler e Slivka, 1996).

A peroxidação lipídica (LPO), medida como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tem sido reportada como a maior responsável pela perda da função celular em condições de estresse oxidativo, sendo utilizada como biomarcador em diversos estudos (Huang et al., 2003; Barata et al., 2005; Cattaneo et al., 2011). Peroxidação lipídica é um mecanismo de lesão celular causado por reações de radicais livres de oxigênio nas membranas biológicas, ricas em ácidos graxos polinsaturados. Este processo forma hidroperóxidos de lipídios, que decompõem a ligação dupla de ácidos graxos insaturados e danifica a membrana celular. Esses lipídios altamente oxidáveis podem atacar proteínas vizinhas, causando uma formação em excesso de proteínas carbonil (Lackner, 1998). A formação de proteína carbonil pode ocorrer como resultado do estresse oxidativo. O teor de proteína carbonil é atualmente o indicador mais comum, sendo o marcador mais utilizado para avaliação da oxidação protéica. EROs convertem grupos amino de proteínas e alteram sua estrutura e função. Uma dessas modificações é a formação de radicais carbonil em aminoácidos de cadeia lateral. Os radicais são quimicamente estáveis, tornando-os úteis para processos de detecção. Grupos carbonil podem ser introduzidos em proteínas por diferentes meios: predominantemente pela oxidação catalisada metálica, mas também por adução de lipídios oxidados ou açúcares que contenham carbonil (Berlett e Stadtman, 1997; Requena et al., 2003; Almoroth et al., 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes densidades de estocagem sobre o crescimento e o status antioxidante em juvenis do linguado *P. orbignyana*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho zootécnico dos linguados mantidos em diferentes densidades de estocagem.
- Avaliar os efeitos da exposição a diferentes densidades de estocagem no sistema de defesa antioxidante e nos níveis de dano oxidativo no fígado, músculo, cérebro e brânquias de juvenis de linguado.

3. HIPÓTESE

Densidades de estocagem altas são agentes estressores para os juvenis de linguado, resultando em redução do crescimento e induzindo o estresse oxidativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL E INSTALAÇÕES

Inicialmente foi solicitado e obtida uma autorização para execução do experimento pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Rio Grande sob o número de registro 23116.002018/2018-81. O local de estudo foi no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM) do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

4.2. MATERIAL BIOLÓGICO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado com 3280 juvenis de linguado *P. orbignyana* (1,58 ± 0.28g) provenientes da desova obtido no próprio LAPEM da FURG. Os peixes foram mantidos em 16 doze tanques de fibra de vidro com capacidade útil de 40 L a uma

temperatura de 25.0 ± 0.3 °C, salinidade de 27 ± 4 ‰ e sob um fotoperíodo de 18 horas claro e 6 horas escuro acoplados a quatro sistemas de recirculação de água independentes por 45 dias.

A densidade de peixes foi expressa em porcentagem da cobertura de área (PCA) em relação ao fundo do tanque. Peixes de comprimento total semelhante foram selecionados para serem transferidos para os tanques experimentais e sua área de superfície ventral (corpo do peixe incluindo todas as nadadeiras) e o comprimento total foram estimadas por meio de análise de imagem (Image J), no início e no final do experimento.

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos: 50% de cobertura de fundo (82 indivíduos por tanque), 100% de cobertura de fundo (164 indivíduos por tanque), 150% de cobertura de fundo (246 indivíduos por tanque) e 200% de cobertura de fundo (328 indivíduos por tanque) com quatro repetições cada um.

Os juvenis foram alimentados cinco vezes ao dia (7:30, 11:15, 15:00, 18:45 e 22:30 h) até a saciedade usando uma ração comercial (INVE Orange 2mm) com 55% proteína, 13% lipídios, 13,5% cinzas, 1,0% fibra).

4.3. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Todos os dias, antes da primeira alimentação, foram monitorados: oxigênio dissolvido e temperatura (oxímetro YSI 55), pH (pH meter, WTW 315i), alcalinidade total (Eaton et al. 2005), salinidade (refratômetro óptico, ATAGO® PAL-06S), amônia total (UNESCO, 1983), nitrito (Bendschneider e Robinson 1952) e nitrato (García – Robledo et al. 2014).

4.4. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Os juvenis de linguado foram anestesiados com hidrocloreto de benzocaína (50 ppm) para realização das coletas de dados biométricos (n=35/tanque), com auxílio de uma balança (Marte, BL3200 H 0,01g) e assim avaliar o crescimento dos linguados de cada tratamento.

Ao final do experimento, todos os peixes foram contados para o cálculo da sobrevivência. Com os dados obtidos durante o experimento foram calculados os seguintes parâmetros:

- a) Ganho diário de peso: $GDP (g \text{ peixe } \text{día}^{-1}) = (B_t - B_0) / B_0 / T * 100$, onde B_t = biomassa de juvenis ao dia 45(g), B_0 = biomassa de juvenis ao início do experimento (g), T = tempo do experimento (dias).
- b) Taxa de crescimento específico diário: $TCE (\% / \text{dia}) = [(\ln pf - \ln pi) / t] * 100$, onde pi é o peso inicial (g), pf é o peso final (g) e t é o tempo (dias);
- c) Conversão alimentar aparente: $CAA = AO / GP$, onde AO é a quantidade de alimento oferecido (g) e GP é o ganho de peso dos peixes (g);
- d) Percentagem de cobertura de área (% PCA): $PCA = (AST * N * 100) / A$, onde AST é a área de superfície total dos peixes, N é a quantidade de peixes, A é a área disponível para o cultivo (cm^2);
- e) Fator de condição: $FC = pf / cf^3$, onde pf e cf são respectivamente o peso e o comprimento final.
- f) Coeficiente de variação (CV_{BW}) = $100 * (DP / BW)$, onde DP é o desvio padrão e BW é a média do peso (g)

4.5. MEDIÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

4.5.1. Amostragem e homogeneização de órgãos

Para realizar os parâmetros bioquímicos, 12 indivíduos de cada tanque foram aleatoriamente removidos ao final do experimento, e foram imediatamente sacrificados com uma dose letal de cloridrato de benzocaína (500 ppm) e amostras de brânquias, fígado, cérebro e músculo foram coletadas, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) para posterior análise. Amostras de tecido branquial, hepático, cerebral e muscular foram homogeneizadas (1: 5; p / v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,75) com EDTA (2 mM) e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mM) (Rocha et al., 2009). Os sobrenadantes resultantes da centrifugação dos homogeneizados ($20000 \times g$, 20 minutos, 4°C) foram utilizados para as análises. A quantificação da proteína total foi realizada pelo método de Biuret ($\lambda = 550 \text{ nm}$) em triplicata, utilizando um leitor de microplacas (Biotek Synergy HT), como realizado em estudos anteriores (Amado et al.,

2009). A média da concentração protéica (\pm erro padrão) dos tecidos foram, respectivamente: brânquias ($14,03 \pm 0,35$ mg / mL), fígado ($27,67 \pm 1,00$ mg / mL), cérebro ($4,82 \pm 0,16$ mg / mL) e músculo ($18,06 \pm 0,51$ mg / mL).

4.5.2. Medição da capacidade antioxidante total (ACAP)

O ACAP foi detectado de acordo com o método descrito por Amado et al. 2009. Baseia-se na detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em amostras com presença ou ausência de cloridrato de 2,2-azobis(2-metilpropionamidinedi)hidroclorido (ABAP, 4 mM), que a 37 °C gera radicais peroxil. Todas as amostras foram fixadas em 2,0 mg de proteína mL⁻¹. Para a determinação de ROS 2 ' 7-diclorofluoresceína diacetato - H₂DCF-DA, utilizou-se uma concentração final de 40 mM. As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas de fluorescência Biotek Synergy HT (excitação: 485 nm; emissão: 520 nm) com leituras a cada 5 minutos, durante 35 minutos. Os resultados foram expressos como uma área relativa (a diferença entre a área de ROS com e sem ABAP em relação à sem ABAP). Para fins de interpretação dos resultados, uma área relativa maior significa menor capacidade antioxidante e vice-versa (Montserrat et al. 2014).

4.5.3. Peroxidação lipídica - ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos de acordo com Oakes e Van Der Kraak (2003). Para determinar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pela quantificação do malondialdeído (MDA), as amostras (brânquias: 40 μ L; fígado: 80 μ L; cérebro: 50 μ L e músculo: 100 μ L) foram adicionados a uma solução contendo 20 μ L de solução de BHT (67 μ M), 150 μ L de solução de ácido acético a 20%, 150 μ L solução de TBA 0.8%, 50 μ L de água destilada e 20 μ L de SDS a 8,1%. As amostras foram incubadas a 95 °C por 30 min. Posteriormente, 100 μ L de água destilada e 500 μ L de n-butanol foram adicionados à solução final. O sobrenadante remanescente após a centrifugação (3000 x g, 10 minutos, 15 °C) foi utilizado para determinar a fluorescência (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm) e os resultados foram expressos em nmol MDA mg de tecido úmido⁻¹.

4.5.4. Medição da glutatona reduzida intracelular (GSH)

Foi realizado pelo método de White et al. (2003) e Chen et al. (2008) com modificações. O protocolo baseia-se na medição da concentração de GSH pela sua reação com DTNB (5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)). Para o ensaio, 100 µL de sobrenadante, 200 µL de solução de reação (Tris-base 0,4M, pH = 8,9) e 10 µL de DTNB foram então transferidos para microplaca e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. As leituras foram feitas em espectrofluorímetro com leitor de placas (Biotek Synergy HT). A concentração foi expressa em µmoles de GSH por mg de proteína.

4.5.5 Medição da concentração dos grupos de proteínas sulfidrilas (P-SH)

Foi realizado pelo método de Chen et al. (2008) em que mede a concentração do grupo P - SH por sua reação com DTNB (5,5' - Dithiobis (ácido 2 - nitrobenzóico)). Para o ensaio, 240 µl de amostra e 28 µl de ácido tricloroacético (TCA, 50%) foram adicionados aos tubos eppendorf e centrifugados a 14000 rpm a 4 °C por 15 minutos, o precipitado de GSH foi usado e ressuspenso usando 200 µL de tampão de homogeneização para posterior homogeneização. Finalmente, 100 µl de sobrenadante, 160 µL de solução de reação (Tris-base 0,2 M, pH = 8,2) e 10 µL de DTNB foram transferidos para microplacas e incubados por 15 minutos. As leituras foram feitas em espectrofluorímetro com leitor de placas (Biotek Synergy HT), à temperatura ambiente. A concentração foi expressa em µmololes de P-SH por mg de proteína.

4.5.6 Medição da atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada seguindo o método de Habig e Jakob (1981). Neste processo, a absorvência é gerada pela conjugação de 1 mM de GSH (glutathiona reduzida, Sigma-Aldrich) com 1 mM de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, Sigma-Aldrich), a absorvência a 340 nm a 25 °C. Para ler, 15 µL do sobrenadante foram adicionados à microplaca em um fundo plano, em 235 µL de meio de reação (KH₂PO₄ - 0,05 M; K₂HPO₄ - 0,05 M; pH = 7,0), foram adicionados 10 µL de GSH 25 mM. As leituras foram em espectrofluorímetro com um leitor de placas (Biotek Synergy HT). A actividade específica da GST foi expressa em nanomoles do produto CDNB-GSH por minuto por mg de proteína.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os parâmetros de crescimento e estresse oxidativo, os dados foram expressos como média \pm erro padrão (EP). Todos os dados foram analisados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade da variância (teste de Levene) e, quando necessário, esses requisitos foram alcançados por transformação logarítmica. Os dados foram analisados por análise de variância one-way (ANOVA) e, quando foram obtidas diferenças significativas a partir da ANOVA, foram realizadas comparações múltiplas com teste de comparação de médias de Tukey. O nível de significância utilizado foi $P \leq 0,05$ para todos os testes estatísticos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote computacional STATISTIC 7 e as figuras foram feitas usando o GraphPad Prism versão 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

5. RESULTADOS

A saturação de oxigênio dissolvido foi significativamente menor em 200% PCA do que em 50% PCA, 72.63 ± 0.77 e $87.85 \pm 0.60\%$, respectivamente ($p < 0,05$). Temperatura ($25,0 \pm 0,03$ ° C), salinidade (28.6 ± 0.01 ‰), alcalinidade (167 ± 0.50 mg CaCO_3 / L) e pH (7.37 ± 0.04) mantiveram-se dentro da faixa alvo e foram semelhantes entre os tratamentos. A concentração média de nitrogênio amoniacal total (TAN) aumentou com o aumento da densidade de 50% PCA (0.27 ± 0.01 mg N- $\text{NH}_4 + \text{NH}_3$ /L) até 200% PCA (0.37 ± 0.01 mg N- $\text{NH}_4 + \text{NH}_3$ /L), nitrito a concentração variou de 0.34 ± 0.01 a 2.75 ± 0.01 mg N- NO_2 /L e a concentração de nitrato foi de 9.47 ± 0.19 mg N- NO_3 /L (50% PCA) a 18.82 ± 0.30 mg N- NO_3 /L (200% PCA).

Os dados biométricos e de sobrevivência são mostrados na Tabela 1. Diferenças de peso (W), comprimento total (CT), área de superfície total (AST) foram detectadas entre os tratamentos e foi refletido no final do experimento onde os maiores peixes foram aqueles estocados originalmente em 50 e 100 % de PCA, e os menores, aqueles abastecidos em 150 e 200% de PCA. assim como para GPD e TCE, que mostraram uma relação linear inversa com a densidade de estocagem. O aumento na biomassa de peixe por área (BFA) no dia 45 foi de 424%, 408%, 324% e 287% para os tratamentos de 50% de PCA, 100% de PCA, 150% de PCA e 200% de PCA, respectivamente. A densidade de estocagem não teve efeito significativo na sobrevivência. A taxa de alimentação influenciou o coeficiente de variabilidade intragrupo do peso corporal (CvBW). O coeficiente dos valores final e inicial dos coeficientes de CvBW ($\text{CvBW}_f / \text{CvBW}_i$) situou-se entre $0,73 \pm 0.01$ (100% PCA) e $1,21 \pm 0.14$ (50% PCA), enquanto a diferença entre os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$).

TABELA 1 Desempenho zootécnico de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* mantidos em diferentes densidades de estocagem durante 45 dias

| Parametros | Densidade de estocagem (PCA) | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 50% | 100% | 150% | 200% |
| Sobrevivência (%) | 99,77 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Peso final (g) | 8,36 ± 0,25 ^a | 8,14 ± 0,24 ^a | 6,70 ± 0,21 ^b | 6,13 ± 0,18 ^b |
| Cv _{peso} (%) | 1,21 ± 0,25 ^a | 0,73 ± 0,01 ^b | 0,93 ± 0,12 ^{ab} | 1,19 ± 0,04 ^a |
| Biomassa final (Kg/m ²) | 5,40 ± 16,88 | 10,43 ± 21,40 | 13,12 ± 55,91 | 15,97 ± 48,78 |
| TCE (% dia ⁻¹) | 3,68 ± 0,06 ^a | 3,60 ± 0,04 ^a | 3,21 ± 0,08 ^b | 3,02 ± 0,05 ^b |
| Comprimento final (cm) | 9,38 ± 0,11 ^a | 9,45 ± 0,10 ^a | 8,80 ± 0,09 ^b | 8,45 ± 0,08 ^c |
| TCA | 0,76 ± 0,01 ^{ab} | 0,73 ± 0,01 ^b | 0,82 ± 0,03 ^{ab} | 0,76 ± 0,01 ^{ab} |
| <u>Área corporal (cm²)</u> | | | | |
| Inicial | | 7,73 ± 0,09 | | |
| Final | 24,95 ± 0,57 ^a | 24,02 ± 0,51 ^a | 21,02 ± 0,49 ^b | 19,16 ± 0,41 ^b |
| <u>PCA (%)</u> | | | | |
| Inicial | 50 ± 0,19 | 101 ± 0,14 | 151 ± 0,25 | 202 ± 0,19 |
| Final | 163 ± 3,13 | 313 ± 2,61 | 411 ± 9,71 | 500 ± 5,73 |
| Incremento (%) | 222 | 211 | 172 | 148 |

Nota: Os valores são expressos em média ± EP (n=4). Cv_{peso} (coeficiente de variação do peso), PCA (percentagem de área coberta), BFA (biomassa de peixe por área), TCA (taxa de conversão alimentar), TCE (taxa de crescimento específica). Valores com diferentes letras sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p <0,05).

Foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) na capacidade antioxidante total (menor área relativa) nas brânquias de peixes estocados nas densidades de 50, 100 e 150% de PCA, comparados àqueles estocados a 200% PCA após os 45 dias do experimento. (Figura 1a). Em relação ao cérebro e fígado, foi observado que a capacidade antioxidante total foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos peixes estocados a 200% de PCA comparado com aqueles expostos a 50 e 100% PCA (Figura 1b, c). No entanto, para o músculo não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo (Figura 1d).

O conteúdo de GSH nas brânquias foi menor nas densidades de estocagem de 150 e 200% de PCA em comparação com 50 e 100% de PCA (Fig. 2a). O conteúdo de GSH no cérebro e no fígado mostrou um valor mais alto em peixes mantidos a 50, 100 e também 150% de PCA (Fig. 2b, c). Finalmente; no músculo, o conteúdo reduzido de GSH foi observado em 150 e 200% de PCA em relação a 50 e 100% de PCA (fig. 2d).

A atividade de GST nas brânquias foi menor em 50% de PCA em comparação com 100, 150 e 200% de PCA (Fig. 3a). O cérebro dos peixes mantidos em 150 e 200% de PCA mostrou maior atividade de GST em comparação com os de 50 e 100% PCA (Fig. 3b). A atividade da GST no fígado aumentou em peixes mantidos em 200% de PCA em comparação com os outros tratamentos (Fig. 3c). Finalmente, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos na atividade da GST no músculo (Fig. 3d).

O conteúdo de PSH foi maior no fígado de peixes mantidos a 200% de PCA em relação a 150, 100 e 50% de PCA (Fig. 4c). O conteúdo de PSH foi maior nas brânquias, cérebro e músculo de peixes mantidos a 200% PCA, mas nesses órgãos é observado que a partir de 150% PCA são sinais de estresse (Fig. 4a, b, d).

Durante o decorrer do experimento, uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de peroxidação lipídica das brânquias, cérebro e músculo foi verificada nos tratamentos de 50, 100 e 150% PCA comparado aos peixes estocados em 200% PCA (Figura 5a, b, d). No entanto, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) no nível de LPO muscular entre os diferentes tratamentos (Figura 5c).

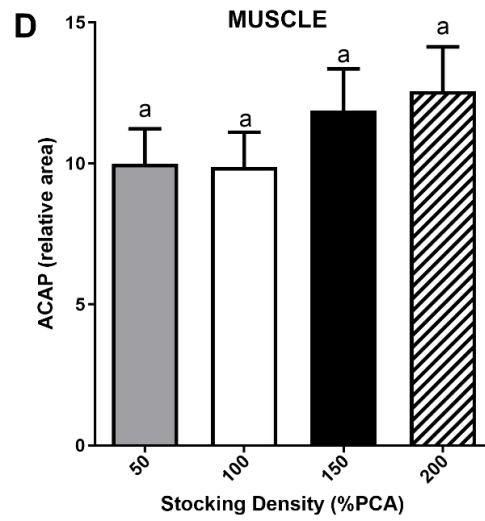
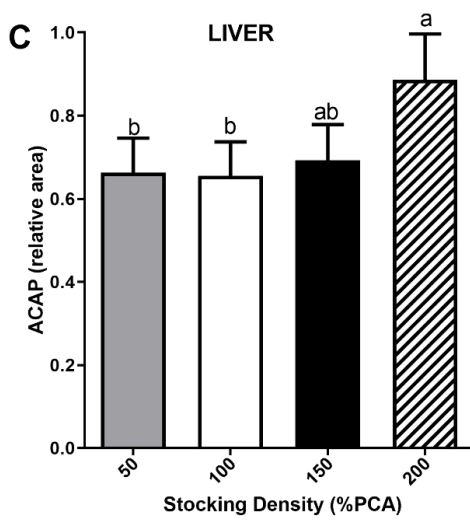
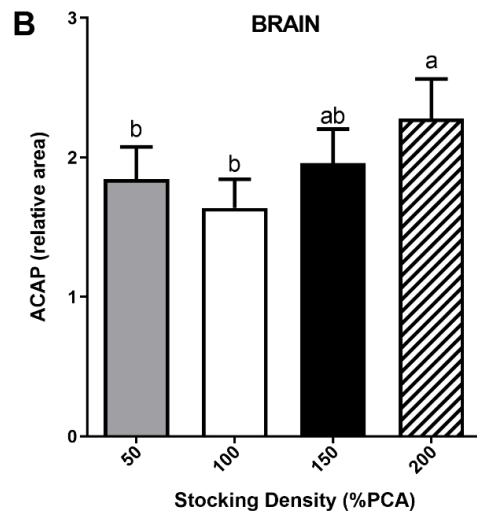
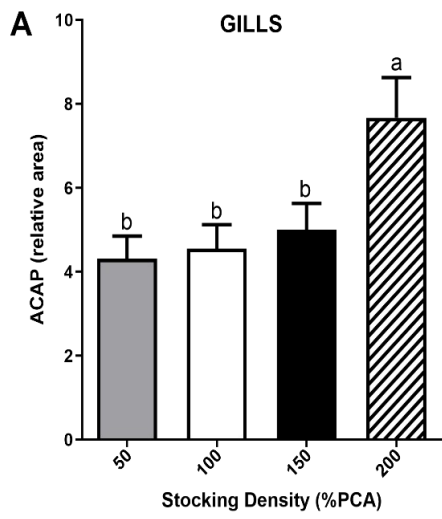


FIGURA 1 Capacidade antioxidante total (ACAP) das brânquias (a), cérebro (b), fígado (c) e músculo (d) do linguado juvenil *Paralichthys orbignyanus* mantidos em diferentes densidades de estocagem (% PCA: porcentagem da área coberta). Os valores são expressos como média \pm EP (n = 16). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

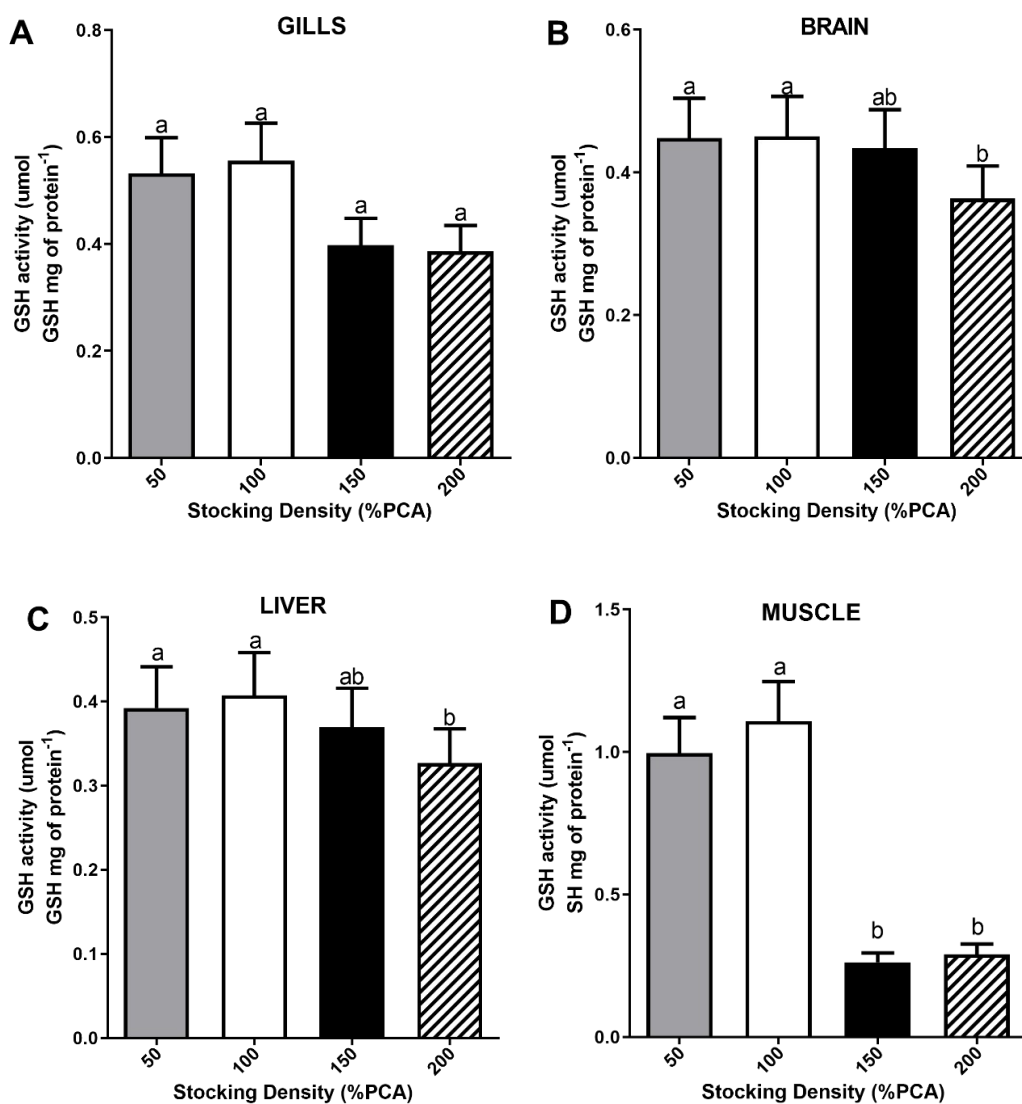


FIGURA 2 Determinação da atividade de GSH das brânquias (a), cérebro (b), fígado (c) e músculo (d) no linguado juvenil *Paralichthys orbignyanus* mantidos em diferentes densidades de estocagem (% PCA: porcentagem da área coberta). Os valores são expressos como média \pm EP (n = 16). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

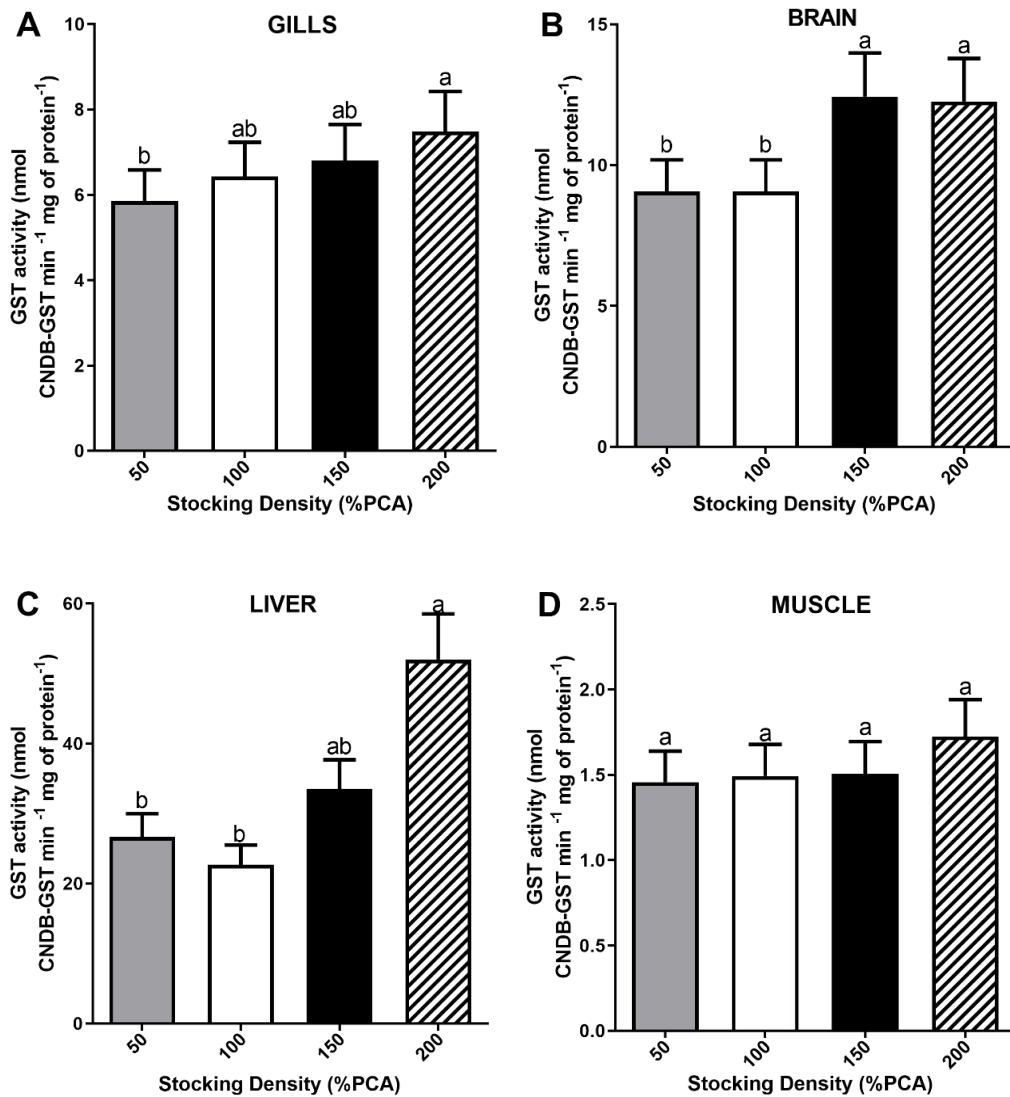


FIGURA 3 Determinação da atividade da glutatona-S-transferase (GST) das brânquias (a), cérebro (b), fígado (c) e músculo (d) no linguado juvenil *Paralichthys orbignyanus* mantidos em diferentes densidades de estocagem (% PCA: porcentagem da área coberta). Os valores são expressos como média \pm EP (n = 16). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tratamentos.

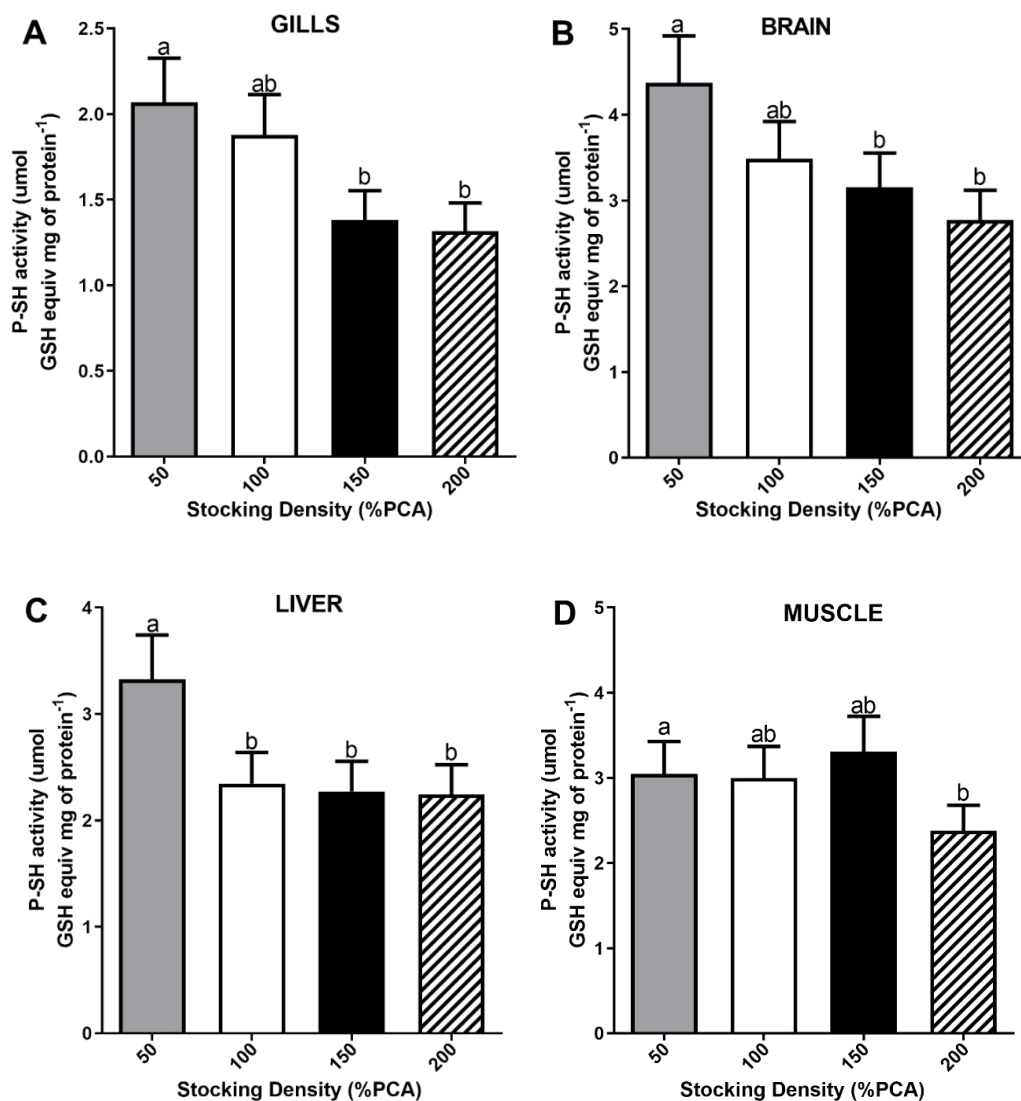


FIGURA 4 Determinação do conteúdo de grupos sulfidril associados à proteína (P-SH) de brânquias (a), cérebro (b), fígado (c) e músculo (d) no linguado juvenil *Paralichthys orbignyanus* mantidos em diferentes densidades de estocagem (% PCA: porcentagem da área coberta). Os valores são expressos como média \pm EP (n = 16). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tratamentos.

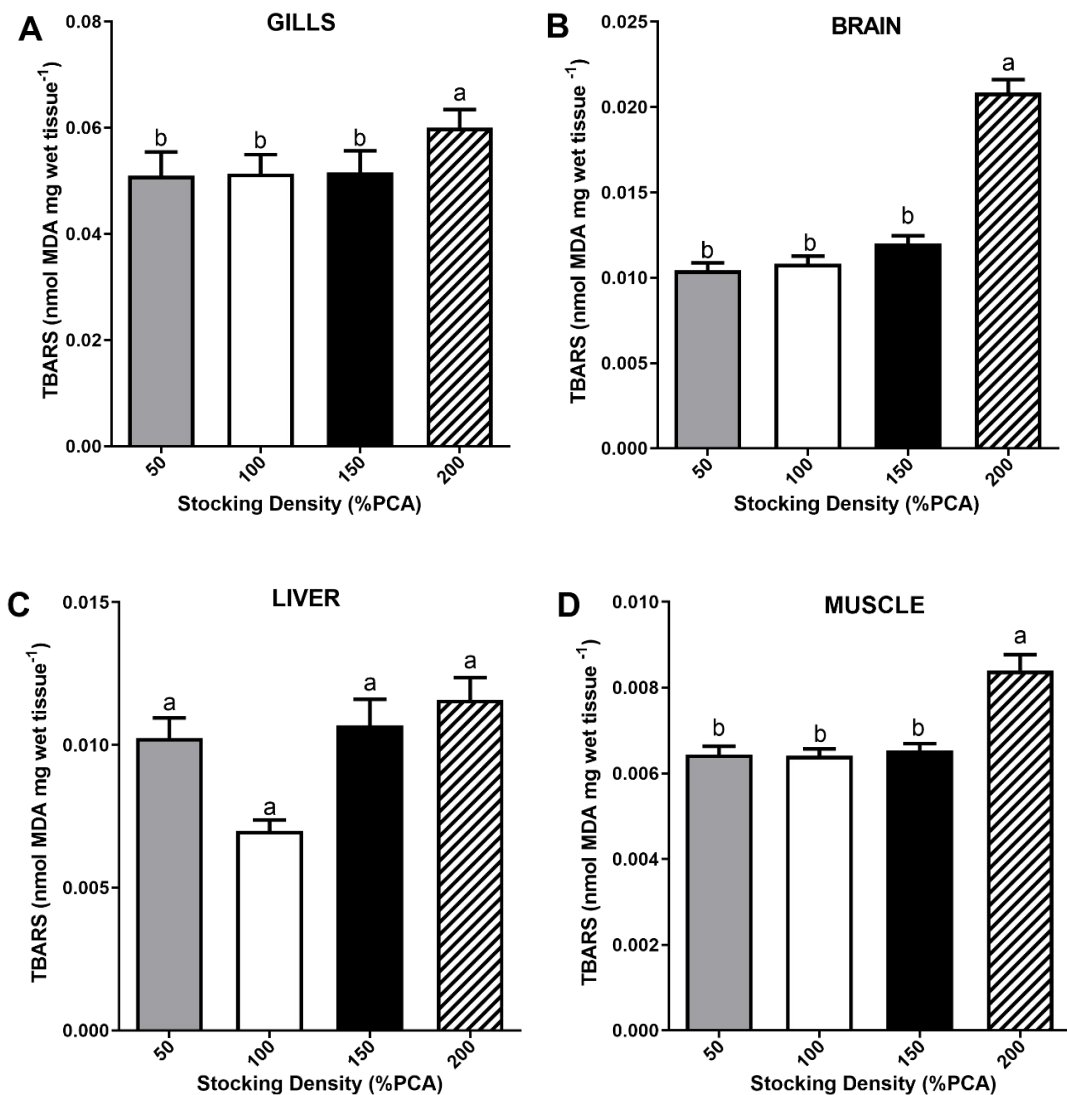


FIGURA 5 Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) de brânquias (a), cérebro (b), fígado (c) e músculo (d) em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* mantidos em diferentes densidades de estocagem (% PCA: porcentagem da área coberta). Os valores são expressos como média \pm EP (n = 16). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo enfatiza que a densidade de estocagem de peixes tem um efeito significativo sobre o crescimento e demais respostas fisiológicas avaliadas. A importância de avaliar o estresse de densidade é determinar as condições ótimas relativas ao bem-estar dos peixes de criação, para um melhor planejamento do projeto. A avaliação do estresse determinada pelas abordagens de análise bioquímica pode, portanto, ser usada para estabelecer uma avaliação mais abrangente do estresse de densidade, proporcionando um nível mais alto de confiança nos dados experimentais subsequentes.

Os parâmetros de qualidade da água foram mantidos dentro dos níveis de segurança recomendados para o linguado brasileiro. Com relação ao efeito do oxigênio dissolvido na fisiologia de linguados, existe uma extensa literatura. Tallqvist et al. 1999 descreve que para juvenis de *Platichthys flesus*, a saturação crítica de oxigênio que causa a diminuição na eficiência alimentar foi de 30%, enquanto Vander Thillar et al. 1994 registrou uma diminuição na atividade em uma saturação de oxigênio de 40%. No presente estudo, a concentração de oxigênio dissolvido foi sempre superior a 70% de saturação, de 88% de saturação de oxigênio (50% PCA) para 72% de saturação de oxigênio (200% PCA); esta queda de oxigênio resultou de um efeito combinado de altas densidades de estocagem (200% e 150%) e a quantidade crescente de alimento oferecido. Os outros parâmetros estavam dentro das faixas de tolerância descritas para *P. orbignyanus*, que tem a capacidade de tolerar ampla faixa de temperatura (Wasielesky et al. 1998), salinidade (Sampaio e Bianchini 2002) e nível de pH (Wasielesky et al. 1997).

No caso de TAN, a pior condição medida foi em 200% de PCA com 0,37 mg TAN/L, o que equivale a 0,003 mg de NH_3 - N/L. Maltez et al. 2017 relataram que 0,12 mg de NH_3 - N/L induz estresse oxidativo e respostas antioxidantes em juvenil de linguado brasileiro. Merino et al. (2007) relataram para *Paralichthys californicus* que o crescimento não foi afetado quando os peixes foram expostos até 0,05 mg de NH_3 - N/L. Portanto, a maior concentração de amônia não ionizada registrada no presente estudo está dentro de uma faixa segura.

Para nitrito, relatos sobre o efeito no linguado brasileiro incluem o estudo de Maltez et al. 2018, onde concentrações entre 5,72 e 15,27 mg NO_2 /L comprometeram o

sistema antioxidante global e induziram estresse oxidativo. Portanto, a pior concentração de nitrito registrada no presente estudo está dentro de um intervalo seguro.

A sobrevivência do linguado brasileiro não foi afetada dentro da faixa das densidades de destocagem testadas no presente experimento. Embora existam estudos que relatam uma correlação inversa entre sobrevivência e densidade (Yang e Lin 2001, Hitzfelder et al. 2006, Rowland et al. 2006), há também outros em que eles não relatam nenhum efeito significativo da densidade na sobrevivência (Webb e outros 2007, Salas Leiton e outros 2010, Laiz-Carrión e outros 2012, Riche e outros 2013).

O desempenho do crescimento foi influenciado negativamente quando a densidade estava acima de um determinado valor. Resultados semelhantes também foram obtidos em estudos anteriores com diferentes espécies de peixes (Wang et al. 2018, Guo et al. 2017, McKenzie et al. 2012, Castillo Vargas et al. 2012, Sanchez et al. 2011). No entanto, alguns estudos em outros linguados não mostraram efeito significativo na TCE por essa variável (Andrade et al. 2015, Salas Leiton et al. 2008, Aijun et al. 2006, Fairchild e Howell 2001); e também, nenhum efeito significativo da densidade de estocagem foi encontrado nos parâmetros de crescimento para *Scophthalmus maximus* (Martínez-Tapia e Fernandez-Pato 1991), *Paralichthys dentatus* (King et al. 1998) ou *Pseudopleuronectes americanus* (Fairchild e Howell 2001). Por outro lado, estudos realizados em *Paralichthys californicus* (Merino et al. 2007), *Hippoglossus hippoglossus* (Kristiansen et al. 2004), *Scophthalmus maximus* (Liu et al. 2017, Liu et al. 2016, Andrade et al. 2015, Irwin et al., 1999) e *Scophthalmus rhombus* (Herrera et al., 2012) mostraram efeitos negativos no desempenho do crescimento quando a densidade de estocagem foi aumentada.

Guo et al. 2017 também relatou que algumas interações sociais (estruturas hierárquicas) aumentam com o aumento da densidade de estocagem. Além disso, um indicador de estabelecimento de hierarquias em peixes é o aumento do coeficiente de variabilidade do peso corporal (CV) (Irwin et al. 1999, North et al. 2006, Lambert e Dutil 2001). Neste estudo, o CV aumentou significativamente de 100% para 200% de PCA. Os resultados mostraram uma competição intraespecífica por alimento e espaço (Duan et al. 2011, Liu et al. 2016) e foram semelhantes aos encontrados por Jia et al. 2016 e Li et al. 2013 para juvenis de turbot. Portanto, estudos comportamentais dos

mecanismos de interação social que causam redução do crescimento com o aumento da densidade de estocagem podem ser necessários para pesquisas futuras.

O fator de condição de Fulton (K) é um indicador do bem-estar geral do peixe. O linguado brasileiro no presente estudo apresentou valor de K entre 0.984 e 1.016; valores próximos aos encontrados para o linguado da Califórnia (Merino et al. 2007), e que, de acordo com a definição de condição de Fulton, serão considerados peixes saudáveis.

Os peixes, como outros organismos aeróbicos, têm um complexo sistema antioxidante com várias defesas enzimáticas e não enzimáticas para proteger os tecidos contra danos oxidativos (Halliwell e Gutteridge 2015). A avaliação da capacidade antioxidante total (ACAP) fornece o estado geral antioxidante do peixe, sem distinguir entre componentes enzimáticos e não enzimáticos. ACAP nos tecidos do linguado brasileiro foi comprometida em brânquias, cérebro e fígado na densidade de 200% PCA em comparação com os outros 3 tratamentos (Fig 1a, b, c), indicando que há uma variabilidade na competição antioxidante entre os diferentes órgãos (Maltez et al. 2017). Caipang et al. 2008, 2009 relatou que o estresse de superlotação diminuiu o nível de capacidade antioxidante e conseqüentemente o nível de enzimas envolvidas na defesa antioxidante. Além disso, Yarahmadi et al. 2016 mostrou uma diminuição na capacidade antioxidante sérica total em trutas criadas a uma densidade de 80 kg/m³ após 30 dias em comparação com densidades de 10 e 40 kg/m³. Finalmente, essa diminuição da ACAP no tratamento de 200% PCA nesses órgãos tem sido indicada, havendo a supressão da defesa oxidativa, provavelmente devido ao dano do sistema de defesa oxidativo após a exposição a uma situação de superlotação (Braun et al. 2010); bem como, ao uso de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo para eliminar as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas em células e tecidos devido à situação de estresse oxidativo (Nagae et al. 1994, Caipang et al. 2009).

GSH é o tiol não proteico intracelular mais abundante e, em função de suas propriedades antioxidantes, é capaz de proteger as células das ROS formadas durante a respiração mitocondrial normal e o metabolismo de substâncias químicas externas (Hammond et al., 2004). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram uma diminuição da atividade da GSH em todos os órgãos analisados com o aumento da

densidade de estocagem. Isso poderia ser devido ao aumento do consumo de GSH via GST ou pode ter reagido diretamente com ROS, levando a atenuar os efeitos deletérios das espécies ativas de oxigênio que não foram metabolizadas pelo sistema enzimático de defesas antioxidantes, definido aqui como o desequilíbrio entre a peroxidação lipídica e as defesas antioxidantes (Droge 2002). Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a glutathiona pode constituir um bom indicador metabólico do estresse oxidativo em linguado brasileiro.

Neste estudo, juvenis de linguado mantidos em 200% PCA apresentaram redução na concentração de P-SH em todos os órgãos analisados, indicando maior dano oxidativo à proteína. Isso se deve ao fato de que os radicais livres atacam os aminoácidos das proteínas pela oxidação dos grupos sulfidrilas (Ferreira et al., 1997). Da mesma forma, poderia resultar de uma melhor síntese de tióis, diminuir o consumo e/ou a degradação (Husak et al., 2017). Além disso, o GSH pode modificar covalentemente os resíduos de cisteína de tióis proteicos em um processo reversível chamado S-glutathionilação, evitando danos oxidativos irreversíveis (Jakob e Reichmann 2013).

GST é uma importante enzima para a biotransformação de xenobióticos e degradação de compostos endógenos (Blanchette et al 2007), está envolvida na via do estresse oxidativo e catalisa a conjugação de GSH com xenobióticos nucleófilos ou componente nuclear prejudicado por ROS (Rathod et al. 2011) e é um biomarcador bioquímico útil de estresse ambiental (Carvalho Neta e Abreu Silva 2013). No presente trabalho, peixes mantidos a 200% PCA apresentaram maiores níveis de atividade de GST nas brânquias, cérebro, fígado e músculo, implicando que condições de alta densidade de estocagem poderiam responder à produção de espécies reativas de oxigênio em linguado brasileiro, porque houve um aumento de a atividade das enzimas antioxidantes GST, a fim de combater os peróxidos, os radicais livres menos prejudiciais (Sayeed et al 2003); e, foi fundada com outros relatórios, onde eles confirmaram que alta densidade de estocagem poderia induzir estresse oxidativo (Liu et al 2017, Jia et al 2016, 2017).

A peroxidação lipídica é considerada um valioso biomarcador do dano oxidativo de constituintes celulares (Morales et al. 2004, Pérez-Jiménez et al. 2012). No presente estudo, a peroxidação lipídica aumentou com o aumento da densidade de estocagem em

todos os órgãos avaliados, sugerindo que maior densidade de estocagem resulta em aumento da peroxidação e degradação celular em linguado brasileiro. Dentre os órgãos analisados, as brânquias apresentaram maiores níveis basais de TBARS e menor teor de grupo tiol, indicando um ambiente pró-oxidante preexistente e mais intenso, tornando-o mais suscetível a danos oxidativos durante um evento de estresse. Este resultado pode indicar efeitos mais graves, possivelmente relacionados a uma diminuição nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados devido à degradação oxidativa precoce (Sun et al. 2014b), e poderia explicar a razão para os níveis reduzidos de TBARS no fígado de peixes mantidos em 150 e 200% de PCA. No entanto, TBARS hepático reduzido também pode estar relacionado a uma maior desintoxicação dos produtos finais de LPO, como o MDA, devido ao aumento concomitante na atividade da GST. As respostas ao estresse oxidativo podem ser influenciadas pelo metabolismo e pela condição redox basal de cada órgão (da Rocha et al., 2009).

Finalmente, estudos anteriores mostraram que a densidade aumentou a peroxidação lipídica e alterou a atividade das enzimas antioxidantes no soro e no tecido (Liu et al. 2017, Sahin e outros 2014, Braun e outros 2010, Kucukbay e outros 2009, Trenzado e outros 2008); mas, por outro lado, Wang et al. 2013, relatou que o nível de TBARS do bagre africano não foi afetado pela densidade de estocagem.

7. CONCLUSÕES

Os juvenis de linguados brasileiro podem ser criados em uma densidade de estocagem de 100% PCA sem mostrar nenhum sinal de estresse. Da mesma forma, quando a densidade de estocagem chega a 150% de PCA, o desempenho de crescimento e a resposta fisiológica foram adversamente afetados, com tendência a aumentar a produção de radicais livres que poderiam danificar o sistema de defesa antioxidante. Perturbações de processos relacionados à ERO em resposta ao linguado juvenil brasileiro à densidade populacional foram mais pronunciadas no cérebro entre os quatro tecidos analisados. Finalmente, os resultados obtidos exigem novos caminhos para futuras investigações.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, densidades de estocagem a partir de 150 % PCA devem ser evitadas nos sistemas de produção do linguado *P. orbignyanus*, uma vez que foram capazes de causar estresse nos juvenis. No presente estudo, mesmo que a densidade de estocagem de 100 % PCA tenha sido a melhor em relação ao desempenho zootécnico e tolerância as condições estressantes para os animais, recomenda-se que futuros trabalhos sejam realizados avaliando algum antioxidante na elaboração e formulação de ração, o que poderá melhorar o estado fisiológico dos organismos a altas densidades dos organismos e assim incrementar a produtividade da produção aquícola para essa espécie.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIJUN, M., CHAO, CH., JILIN, L., SIQING, CH., ZHIMENG, Z., YINGENG, W., 2006. Turbot *Scophthalmus maximus*: stocking density on growth, pigmentation and feed conversion. **Chin. J. Oceanol. Limnol** 24(3), 307–312.
- ALMROTH, B.C., STURVE, J., BERGLUND, A., FÖRLIN, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic toxicology** 73, 171–80.
- AMADO, L.L., LONGARAY GARCIA, M., RAMOS, P.B., FREITAS, R.F., ZAFALON, B., RIBAS FERREIRA, J.L., YUNES, J.S., MONSERRAT, J.M., 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.
- ANDRADE, T., AFONSO, A., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., OLIVA-TELES, A., DE LAS HERAS, V., MANCERA, J.M., SERRADEIRO, R., COSTAS, B., 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. **Aquaculture** 438, 6-11.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G.A., MORAES, G., 2009. Interação do exercício de natação sustentada e da densidade de estocagem no desempenho e na composição corporal de juvenis de matrinxã *Brycon amazonicus*. **Ciência Rural**, v.39, n1, p.201-208.
- AYROZA, L. M. S., ROMAGOSA, E., AYROZA D. M. M. R., SCORVO FILHO J. D., SALLES F. A., 2011. Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia-do-nilo em tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.2, p.231-239.
- BARATA, C., VARO, I., NAVARRO, J.C., ARUN, S., PORTE, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology C** 140, 175–86.
- BARTON B. 2000. Stress. Pages 892-898 in R.R. Stickney, editor. Encyclopedia of aquaculture. John Wiley and Sons, Inc., New York, New York, USA.

- BARTON, B., 2002. Stress in Fish: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, 42: 517 – 255.
- BARTON, B.A., IWAMA, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, 1: 3 - 26.
- BENDSCHNEIDER, K., ROBINSON, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. **Journal of Marine Research**, 11:87-96.
- BENOVIT, S.C., GRESSLER, L.T., SILVA, L.L., GARCIA, L.O., OKAMOTO, M.H., PEDRON, J.S., SAMPAIO, L.A., RODRIGUES, R.V., HEINZMANN, B.M., BALDISSEROTTO, B., 2012. Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 43: 896 - 900.
- BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R., 1997. Protein Oxidation in aging, disease, and oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry** 272 (33), 20313-20316.
- BIANCHINI, A., WASIELESKY, W., FILHO, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. **Bull Environ Contam Toxicol** 56,453–459.
- BIANCHINI, A., ROBALDO, R.B., SAMPAIO L. A. 2010 Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*). In: BALDISSEROTTO B. e GOMES L. C. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. **Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria**, 559 - 587.
- BISWAS, G., GHOSHAL, T.K., NATARAJAN, M., THIRUNAVUKKARASU, A.R., SUNDARAY, J.K., KAILASAM, M., DE, D., SUKUMARAN, K., KUMAR, P., PONNIAH, A.G., 2013. Effects of stocking density and presence or absence of soil base on growth, weight variation, survival and body composition of pearlspot, *Etroplus suratensis* (Bloch) fingerlings. **Aquaculture Research** 44, 1266–1276.
- BJÖRNSSON, B., STEINARSSON, A., ODDGEIRSSON, M., ÓLAFSDÓTTIR, S.R., 2012. Optimal stocking density of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared in a land-based farm. **Aquaculture**, 356: 342 – 350.

- BLANCHETTE, B., FENG, X., SINGH, B.R., 2007. Marine glutathione S-transferases. **Mar. Biotechnol.** 9, 513-542
- BOLASINA S. 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. **Aquaculture**, 313: 140 - 143.
- BOLASINA S., TAWAQA M., YAMASHITA Y., TANAKA M. 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, 259: 432 - 443.
- BRAUN, N., DE LIMA, R.L., BALDISSEROTTO, B., DAFRE, A.L., DE OLIVEIRA NUÑER, A.P., 2010. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. **Aquaculture** 301, 22–30.
- CAIPANG, C.M.A., BRINCHMANN, M.F., BERG, I., IVERSEN, M., ELIASSEN, R., KIRON, V., 2008. Changes in selected stress and immune-related genes in Atlantic cod, *Gadus morhua*, following overcrowding. **Aquacult Res.** 39,1533–1540.
- CAIPANG, C.M.A., BERG, I., BRINCHMANN, M.F., KIRON, V., 2009. Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. **Aquaculture**. 295,110–115.
- CARVALHO-NETA, R.N., ABREU-SILVA, A.L., 2013. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. **Lat Am J Aquat Res** 41, 217-225.
- CASTILLO VARGAS MACHUCA S., PONCE PALAFOX J., GARCIA ULLOA M., ARREDONDO FIGUEROA J., RUIZ LUNA A., CHAVEZ E., TACON A. 2012. Effect of stocking density on growth performance and yield of subadult Pacific red snapper cultured in floating sea cages. **North American Journal of Aquaculture**, 74: 413 – 418.
- CASTRO, C., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., GUERREIRO, I., PERES, H., CASTRO-CUNHA, M., OLIVA-TELES, A., 2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). **Comp Biochem Physiol A** 163, 372–378.

- CATTANEO, R., CLASEN, B., LORO, V.L., MENEZES, C.C., MORAES, B., SANTI, A., TONI, C., AVILA, L.A., ZANELLA, R., 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to the herbicide penoxsulam in rice field conditions. **Journal of Applied Toxicology** 31, 626-632.
- CHANDROO, K.P., COOKE, S.J., MCKINLEY, R.S., MOCCIA, R.D., 2005. Use of electromyogram telemetry to assess the behavioral and energetic responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress. **Aquaculture Research** 36, 1226-1238
- CHEN, W., ZHAO, Y., SEEFELDT, T., GUAN, X., 2008. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. **J Pharm Biomed Anal** 48 (5), 1375–1380
- CONTE, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 86, 205- 223.
- DA ROCHA, A.M., DE FREITAS, D.S., BURNS, M., VIEIRA, J.P., DE LA TORRE, F.R., MONSERRAT, J.M., 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.
- DOU, S., MASUDA, R., TANAKA, M., TSUKAMOTO, K., 2004. Size hierarchies affecting the social interactions and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture** 233, 237–249.
- DORVAL, J., LEBLOND, V., DEBLOIS, C., HONTELA, A., 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry** 24(5), 1273– 1280.
- DROGE, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** 82 (1),47-95.
- DUAN, Y., DONG, X., ZHANG, X., MIAO, Z., 2011. Effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on the growth, energy budget and body composition of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). **Aquacult. Res.** 42, 407–416.

- EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W., GREENBERG, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, **21st edition American Public Health Association**, Washington.
- FAIRCHILD, E., HOWELL, W.H., 2001. Optimal stocking density for juvenile winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 32(3): 300 – 308.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture – Contributing to food security and nutrition for all. Rome
- FERREIRA A.L.A., MATSUBARA L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43 (1): 61-68
- FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Museu de Zoologia / USP, São Paulo.
- FRISCH A., ANDERSON T. 2005. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, 140: 317 - 327.
- FRUGOLI, J.A.; ZONGH, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; MCCLUNG, C.R, 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) **Heynh. Plant Physiol.** 112: 327-336.
- GARCIA, E., CORZO, A., PAPASPYROU, S. 2014. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. **Marine Chemistry** 162, 30 - 36.
- GARCIA L. O., OKAMOTO M. H., RIFFEL A. P. K., SACCOL E. M., PAVANATO M. A., SAMPAIO L. A. 2015. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes,1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, 13: 607 - 612.
- GUL, M.; KUTAY, F. Z.; TEMOCIN, S.; HAANNINEN, O., 2000. Cellular and Clinical implications of glutathione. *Ind. J. Exper. Biol.* 38: 625-634
- GUO, H.Y., DONG, X.Y., ZHANG, X.M., ZHANG, P.D., LI, W.T., 2017. Survival, growth and physiological responses of juvenile japonese flounder (*Paralichthys*

- olivaceus*, Temminck & Schelegel, 1846) exposed to different dissolved oxygen concentrations and stocking densities. **J. Appl. Ichthyol.** 33 (4), 1-9
- HABIG W. H., JAKOBY W. B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, 77: 398 – 405.
- HALLIWEL B., GUTTERIDG J. M. 2015. Free radicals in biology and medicine, Fifth edition. Oxford University Press, EUA.
- HAMMOND. C.L., MADEJCZYK, M.S., BALLATORI, N., 2004. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 195: 12-22.
- HENGSAWAT K., WARD F.J., JARURATJAMORN P. 1997. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. **Aquaculture**, v.152, p.67-76.
- HERRERA, M., VARGAS CHACOFF, L., HACHERO, I., RUÍZ JARABO, I., RODILES, A., NAVAS, J.I., MANCERA J.M., 2009. Physiological responses of juvenile wedge sole *Dicologlossa cuneate* (Moreau) to high stocking density. **Aquatic Research**, 40: 790 – 797.
- HERRERA, M., RUIZ-JARABO, I., HACHERO, I., VARGAS-CHACOFF, L., AMO A., MANCERA, J.M., 2012. Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill *Scophthalmus rhombus*. **Aquaculture International** 20,1041–1052.
- HITZFELDER, G.M., HOLT, G.J., FOX, J.M., MCKEE, D.A., 2006. The effect of rearing density on growth and survival of cobia, *Rachycentron canadum*, larvae in a closed recirculating aquaculture system. **J World Aquacult Soc** 37(2), 204-209.
- HUANG, C.H., CHANG, R.J., HUANG, S.L., CHEN, W.L., 2003. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Comparative Biochemistry and Physiology B** 134, 265–270.
- HUSAK, V.V., MOSIICHUK, N.M., STOREY, J.M., STOREY, K.B., LUSHCHAK, V. I., 2017. Acute exposure to the penconazole-containing fungicide Topas partially augments antioxidant potential in goldfish tissues. **Comp. Biochem. Phys. C.** 193, 1-8.

- IBARZ, A., MARTIN-PEREZ, M., BLASCO, J., BELLIDO, D., DE OLIVEIRA, E., FERNANDEZ-BORRAS, J., 2010. Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. *Proteomics* 10, 963–975.
- IRWIN, S., O' HALLORAN, J., FITZGERALD, R.D. 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture*, 178: 77 – 88.
- JAKOB, U., REICHMANN, D., 2013. Oxidative stress and redox regulation. Springer, Dordrecht
- JIA, R., LIU, B., FENG, W.R., HAN C., HUANG, B., LEI, J.L., 2016. Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish Shellfish Immunol* 55,131-139
- JOBLING M., BAARDVIK B. M., CHRISTIANSEN J. S., JORGENSEN E. H. 1994. The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish. *Aquaculture International*, v.1, p.95-111.
- KESTEMONT P., BARAS E. 2001. Environmental factors and feed intake: mechanisms and interactions. In. HOULIHAN, D. *et al.* Food intake in fish. Oxford-UK: Blackwell-science. Chap.6, p.131-145.
- KING, N., HOWELL, W.H., FAIRCHILD, E., 1998. The effect of stocking density on the growth of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*. In: Howell W.H., Keller B.J., Park P.K., McVey J.P., Takayanagi K., Uekita Y. (Eds.), U.S. – Japan Aquaculture Symposium, Durham, New Hampshire (USA), 16 – 18 Sep 1997, *Nutrition and Technical Development of Aquaculture*, 26: 173 – 180.
- KRISTIANSEN, T.S., FERNÖ, A., HOLM, J.C., PRIVITERA, L., BAKKE, S., FOSSEIDENGEN, J.E., 2004. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture*, 230, 137-151.
- KÜCÜKBAY, F.Z., YAZLAK, H., KARACA, I., SAHIN, N., TUZCU, M., CAKMAK, M.N., SAHIN, K., 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquaculture Nutrition* 15 (6), 569-576.

- LABATUT, R., OLIVARES, J., 2004. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles using shallow raceways tanks and recirculation. **Aquacultural Engineering** 32, 113–127.
- LACKNER, R., 1998. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. **Fish Ecotoxicology**, 203–224.
- LAIZ-CARRIÓN, R., VIANA, I.R., CEJAS, J.R., RUIZ-JARABO, I., JEREZ, S., MARTOS, J.A., BERRO, A., MANCERA, J.M., 2012. Influence of food deprivation and high stocking density on energetic metabolism and stress response in red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquacult Int** 20(3), 585-599.
- LAMBERT, Y., DUTIL, J.D., 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and sizegrading. **Aquaculture** 192, 133-147.
- LI, X., LIU, Y., BLANCHETON, J.P., 2013. Effect of stocking density on performances of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) in recirculating aquaculture systems. **Chinese J. Oceanol. Limnol.** 31(3), 514 – 522.
- LIANG, Z., LIU, R., ZHAO, D., WANG, L., SUN, M., WANG, M., SONG, L. 2016. Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & Shellfish Immunology**, 54, 523-528.
- LIU, B., JIA, R., HAN, C., HUANG, B., LEI, J.L., 2016. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). [Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol](#) 190, 1-8.
- LIU, B., JIA, R., ZHAO, K., WANG, G., LEI, J.L., HUANG B., 2017. Stocking density on growth and stress response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in land-based recirculating aquaculture system. *Acta Oceanol Sin* 36 (10),31-38.
- LOUZADA, L.R., 2004. Efeito do fotoperíodo na sobrevivência e crescimento de larvas de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Dissertação de mestrado. FURG.
- MALTEZ, L., RODRIGUES, G., ENAMORADO, A., OKAMOTO, M., ROMANO, L., MONSERRAT, J., SAMPAIO, L., GARCIA, L., 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian

- flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Fish Physiology Biochemical**, 43(6): 1747 – 1759.
- MALTEZ, L.C., BARBAS, L.A., NITZ, L.F., PELLEGRIN, L., OKAMOTO, M.H., SAMPAIO, L.A., MONSERRAT, J.M., GARCIA, L., 2018. Oxidative stress and antioxidante responses in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* exposed to sublethal levels of nitrite. *Fish Physiol Biochem* 44(5), 1349–1362.
- MALLICK, N., MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **J. Plant Physiol.** 157: 183-193, 2000
- MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura, Jaboticabal – S.P: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, p.81-95, 2006.
- MCKENZIE, D. J., HÖGLUND, E., DUPONT-PRINET, A., LARSEN, B. K., SKOV, P.V, PEDERSEN, P. B., JOKUMSEN, A. 2012. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. **Aquaculture**, 338–341, 216–222.
- MERINO G., PIEDRAHITA R., CONKLIN D. 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. **Aquaculture**, 265: 176 - 186
- MILLNER R., WALSH S. J., DIAZ DE ASTARLOA J. M. 2005. Atlantic flatfish fisheries. In: Gibson, R. N., Nash, R. D. M., Geffen, A. J., Van Der Veer, H. W. (Eds.), Flatfishes: Biology and Exploitation. **Blackwell Science Ltd**, Oxford, 240-271.
- MOBERG, G.P., 1985. Biological response to stress: Key to assessment of well-being? In: MOBERG, G. P. (ed.) Animal stress. Bethesda: American Physiological Society, 27-29.
- MONSERRAT, J.M., GARCIA, M.L., VENTURA-LIMA, J., GONZALEZ, M., BALLESTEROS, M.L., MIGLIORANZA, K.S., AME, M.V., WUNDERLIN, D.A., 2014. Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia multidentata* (Anablipidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. **Pestic Biochem Physiol** 108,8–15.

- MORALES, A.E., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., HIDALGO, M.C., ABELLÁN, E., CARDENETE, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. **Comp. Biochem. Physiol.** 139, 153–161.
- NAGAE, M., FUDA, H., URA, K., KAWAMURA, H., ADACHI, S., HARA, A., YAMAUCHI, K., 1994. The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Fish Physiol Biochem** 13,41-8.
- NIEUWEGIESSEN P. G. Van de, BOERLAGE A. S., VERRETH J. A. J., SCHRAMA J. W. 2008. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. **Applied Animal Behaviour Science**, v.115, p.233-243.
- NORTH, B., TURNBULL, J., ELLIS, T., PORTER, M., MIGAUD, H., BRON, J., BROMAGE, N., 2006. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 255, 466–479.
- OAKES K. D, VAN DER KRAAK G. J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, 63: 447 - 463.
- O'BRIEN, M., KRUIH, G.D., TEW, K.D., 2000. The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 480–487.
- OKAMOTO M. H., SAMPAIO L. A. 2012. Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. **Atlântica** 34: 57-61.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, A., PERES, H., RUBIO, V.C., OLIVA-TELES, A., 2012. The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comp Biochem Physiol C* 155, 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.005deboeck>
- PICKERING, A.D., 1981. Stress and fish. London: Academic Press
- REQUENA, J.R., LEVINE, R.L., STADTMAN, E.R., 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* 25, 221–226

- RICHE, M.A., WEIRICH, C.R., WILLS, P.S., BAPTISTE R.M., 2013. Stocking density effects on production characteristics and body composition of market size cobia, *Rachycentron canadum*, reared in recirculating aquaculture systems. **J World Aquacult Soc** 44(2), 259-266.
- 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*. **Journal of Applied Ichthyology**, 28: 815 - 817.
- ROWLAND, S.J., MIFSUD, C., NIXON, M., 2006. Effects of stocking density on the performance of the Australian freshwater silver perch (*Bidyanus bidyanus*) in cages. **Aquaculture** 253(1-4), 301-308.
- SAHIN, K., YAZLAK, H., ORHAN, C., TUZCU, M., AKDEMIR, F., SAHIN, N., 2014. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. **Aquaculture** 418,132-138.
- SALARO A. L., LUZ R. K., NOGUEIRA G. C. C., NOGUEIRA G. C. C. B., REIS A., SAKABE R., LAMBERTUCCI D. M. 2003. Effect of two stocking rates on the trairão (*Hoplias cf. lacerdae*) fingerlings performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1033- 1036.
- SALAS-LEITON, E., ANGUÍS, V., MANCHADO, M., CAÑAVATE, J.P., 2008. Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. **Aquaculture** 285:84-89.
- SALAS-LEITON, E., ANGUÍS, V., MARTÍN-ANTONIO, B., CRESPO, D., PLANAS, J.V., INFANTE, C., CAÑAVATE, J.P., MANCHADO, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. **Fish Shellfish Immunol** 28 (2): 296-302.
- SHRECK, C.B., 2010. Stress and reproduction: the roles of allostasis and hormesis. **Gen. Comp. Endocrinol.** 165, 549-556.
- SAMPAIO L. A., BIANCHINI A. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 269: 187 - 196.
- SAMPAIO L. A., FREITAS L. S., OKAMOTO M. H., LOUZADA L. R., RODRIGUES R. V., ROBALDO R. B. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder

- Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. **Aquaculture**, 262: 340 - 346.
- SAMPAIO L. A., ROBALDO R. B., BIANCHINI A. 2008. Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). **Aquaculture Research**, 39: 712 - 717.
- SÁNCHEZ, P., AMBROSIO, P.P., FLOS, R., 2011. Stocking density affects Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) growth independently of size dispersion, evaluated using an individual photo-identification technique. **Aquaculture Research**, 44: 231-241.
- SAYEED, I., PARVEZ, S., PANDEY, S., BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R., RAISUDDIN, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 56, 295–301.
- SCHWEDLER, T.E., JOHNSON, S.K., 2000. Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. **Animal Welfare Information Center Bulletin** 10, p.3-4
- SIES, H., 2015. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. 4, 180–183.
- STEGEMAN, J.J.; BROWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FORLIN, B.; FOWLER, B.; SANDERS, B.; VAN VELD, P., 1992. Molecular responses to environmental contamination: Proteins and enzymes as indicators of contamination exposure and effects. In *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress* (R. J. Huggett, Ed.), pp. 235–335. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl.
- SUN, H., WANG, W., LI, J., YANG, Z., 2014b. Growth, oxidative stress responses, and gene transcription of juvenile bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) under chronic-term exposure of ammonia. **Environ Toxicol Chem** 33,1726–1731.
- SWANN, J.D., SMITH, M.W., PHELPS, P.C., MAKI, A., BEREZESKY, I.K., TRUMP, B.F., 1991. *Toxicologic Pathology*.
- TALLQVIST, M., SANDBERG-KILP, E., BONSDORFF, E., 1999. Juvenile flounder, *Paralichthys flesus* (L.), under hypoxia: effects on tolerance, ventilation rate and predation efficiency. *J Exper Mar Biol and Ecol*.

- TRENZADO, C.E., MORALES, A.E., PALMA, J.M., DE LA HIGUERA, M., 2009. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. **Comp Biochem Physio C** 149,440–447.
- TURNBULL J., BELL A., ADAMS C., BRON J., HUNTINGFORD F. 2005. Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. **Aquaculture**, v.243, p.121-132.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 13, 57-149
- VAN DER THILLART, G., DALLA VIA, J., VITALI, G., CORTESI, P., 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. **Mar Ecol Prog Ser** 104,109-117.
- VASCONCELOS, S.M., GOULART, M.O., MOURA, J.B., MANFREDINI, V., BENFATO, M.S., KUBOTA, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 30, 1323–1338.
- VENTURA-LIMA, J., DE CASTRO, M.R., ACOSTA, D., FATTORINI, D., REGOLI, F., DE CARVALHO, L.M., BOHRER, D., GERACITIANO, L.A., BARROS, D.M., MARINS, L.F.F., DA SILVA, R.S., BONAN, C.D., BOGO, M.R., MONSERRAT, J.M. 2009. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 149(4), 538-543.
- VIJAYAN M.M., BALLANTYNE J.S, LEATHERLAND J.F. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. **Aquaculture**, v.88, p.371-381.

- WANG, Y., CHI, L., LIU, Q., XIAO, Y., MA, D., XIAO, Z., MA, D., XIAO, Z., XU, S., LI, J., 2018. Effects of stocking density on the growth and immunity of Atlantic salmon *Salmo salar* reared in recirculating aquaculture system (RAS). **J. Ocean. Limnol.** 36, 1–11.
- WANG, X., DAI, W., XU, M., PAN, B., LI, X., CHEN, Y., 2013. Effects of stocking density on growth, nonspecific immune response, and antioxidant status in African catfish (*Clarias gariepinus*). **The Israeli Journal of Aquaculture** 65, 1–6.
- WEBB, JR.K.A., HITZFELDER, G.M., FAULK, C.K., 2007. Growth of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture** 264(1–4), 223–227.
- WASIELESKY W., BIANCHINI A., SANTOS M. H., POERSCH L. H. 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. **Journal of the World Aquaculture Society**, 28: 202 - 204.
- WASIELESKY, W., BIANCHINI, A., MIRANDA FILHO, K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. **Frente Marítimo** 17, 43-48.
- WHITE, C.C., VIERNES, H., KREJSA, C.M., BOTTA, D., KAVANAGH, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Anal Biochem** 318, 175-180
- WU, S.M., LIU, J.H., SHU, L.H., CHEN, C.H. 2015. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 187, 202-213.
- YANG, Y., LIN, C.K., 2001. Effects of biomass of caged Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and aeration on the growth and yields in na integrated cage-cum-pond system. **Aquaculture** 195(3–4), 253–267.
- YARAHMADI, P., MIANDARE, H.K., HOSEINIFAR, S.H., GHEYSVANDI, N., AKBARZADEH, A., 2015. The effects of stocking density on hemato-immunological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquac. Int.** 23, 55–63.
- ZHOU, J., WANG, W.N., WANG, A.L., HE, W.Y., ZHOU, Q.T., LIU, Y., XU, J. 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*:

characterization and regulation under pH stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 150: 224-230.