



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



TOXICIDADE CRÔNICA DO NITRATO SOBRE JUVENIS DO PEIXE-
PALHAÇO *Amphiprionocellaris*

ANASTÁCIA AMÁLIA DAMASCENO RODRIGUES

Rio Grande/RS
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**TOXICIDADE CRÔNICA DO NITRATO SOBRE JUVENIS DO PEIXE-
PALHAÇO *Amphiprionocellaris***

Anastácia Amália Damasceno Rodrigues

Orientador: Dr. Luís André Sampaio

Co-orientador: Dr. Ricardo Vieira Rodrigues

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, 2018**

Ata de Aprovação

Ficha Catalográfica

Dedicatória

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais Pedro (*in memorian*) e Izabel Cristina, irmãos (Rômulo, Lorna, Iasmin e Pedro), minha tia Menta, familiares e aos bons amigos, obrigada pelo convívio e pela singeleza de cada um.

Agradecimentos

Inicialmente a Deus onipotente, meu mestre e confidente. Aos meus pais, Izabel Cristina Carvalho Damasceno e Pedro José Rodrigues Filho (in memoriam), responsáveis por minha existência e por contribuírem para formação da minha essência em gestos humanos e sagrados, da benevolência e do amor, dos bons valores, da educação, princípios e motivações, me revelando que o Sagrado está presente até mesmo na saudade e no silêncio.

Aos meus irmãos Rômulo, Lorna, Iasmin e Pedro pela ajuda mútua, força e convívio feliz, o que faz com que a vida tenha muito mais sentido. A minha querida tia Livramento (tia Menta), pelo apoio e incentivo, amor, carinho e amizade e aos demais familiares.

Ao meu orientador e co-orientador, professores Dr. Luís André Sampaio e Dr. Ricardo Vieira Rodrigues pelo apoio científico, diretrizes e acompanhamento do trabalho, cada um com seu enorme conhecimento transmitiram-me instruções valiosas.

A Universidade Federal do Rio Grande-FURG, e principalmente ao Programa de pós-graduação em Aquicultura (PPG-Aq) do Instituto de Oceanografia, pela oportunidade oferecida para realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e CNPq pelo apoio financeiro, sendo de extrema importância para o alcance dos resultados.

Aos docentes do PPG-Aq pelas informações recebidas e conhecimentos adquiridos em suas disciplinas.

Aos membros da banca examinadora pela análise crítica deste trabalho bem como pelas sugestões oferecidas.

Aos colegas do Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM), especialmente ao Lucas Maltez e Mário Davi, pela amizade e apoio imprescindível no trabalho. Aos amigos Alan, Andreline, Fran, Helly e Inácio, pela parceria, apoio e estímulo o que foi fundamental para que os dias fossem mais leves e a saudade de casa amenizada. Em nome desses gostaria de estender os meus agradecimentos a todos os colegas de pós-graduação, pois de alguma forma foram importantes nessa caminhada durante esses dois anos no Cassino-Rio Grande/RS.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente, colaboraram para que fosse possível a conclusão do meu mestrado.

Índice

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. AQUICULTURA E PISCICULTURA ORNAMENTAL.....	1
1.2. PEIXE-PALHAÇO.....	1
1.3.SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA (RAS).....	2
1.4. NITRATO E SEUS EFEITOS.....	4
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	5
2.OBJETIVO GERAL.....	8
3.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	9
4.2. QUALIDADE DE ÁGUA E MANEJO DOS ANIMAIS.....	10
4.3. ANÁLISES.....	10
4.3.1. BIOQUÍMICA (ESTRESSE OXIDATIVO).....	11
4.3.2. ESTATÍSTICA.....	12
5.RESULTADOS.....	13
5.1.DESEMPENHO ZOOTÉCNICO.....	13
5.2.PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	14
6.DISSCUSSÃO.....	18
7.CONCLUSÃO.....	20
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
9.ANEXO Certificado CEUA.....	29

Resumo

O peixe-palhaço *Amphiprionocellaris*, é uma das espécies de peixes ornamentais marinhas mais importantes, tanto no aspecto extrativo, como no de produção. O nitrato é considerado uma substância com baixo potencial de toxicidade comparado aos demais compostos nitrogenados (amônia e nitrito), mas por ser o produto final da nitrificação, pode acumular em sistemas de produção com baixa troca de água, como os sistemas de recirculação de água. Entretanto, estudos sobre a toxicidade deste composto para peixes marinhos ainda são escassos, e pouco se sabe acerca dos seus efeitos para o peixe-palhaço. Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito crônico do nitrato para juvenis do peixe-palhaço *A. ocellaris*. Para isto, o experimento contou com quatro tratamentos em triplicata, sendo três concentrações de nitrato 30, 60 e 90 mg/L, mais um tratamento controle sem adição de nitrato. Foram utilizados 180 peixes com 20 dias após eclosão ($28,68 \pm 1,09$ mg e $12,09 \pm 0,19$ mm) distribuídos aleatoriamente em 12 tanques com capacidade para 15 L (15 peixes/tanque), aeração constante, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e temperatura controlada (27°C). O experimento teve duração de 42 dias e ao final foram avaliados o desempenho zootécnico e o status oxidativo dos peixes inteiros. Não houve diferença para parâmetros de sobrevivência e desempenho zootécnico, exceto para o fator de condição, porém houve um aumento de TBARS (lipoperoxidação) e Tiol não proteico (NPSH) nas concentrações de nitrato 60 e 90 mg/L. Este aumento de Tiol não proteico (NPSH), corrobora com a atividade da GST (Glutathione S-Transferase) significativamente menor nas mesmas concentrações. Entretanto não foram observadas diferenças para a capacidade total frente a um radical peroxil (ACAP) e Tiol proteico (PSH). Assim este estudo demonstra o nível de até 30 mg/L de $N-NO_3^-$ não causa danos para a produção de juvenis do peixe-palhaço *A. ocellaris*.

Palavras-chaves: Piscicultura marinha, toxicidade, estresse oxidativo.

Abstract

Clownfish *Amphiprionocellaris* is one of the most important marine ornamental fish species, both in extractive and production aspects. Nitrate is considered a substance with a low potential for toxicity compared to other nitrogen compounds (ammonia and nitrite), but because it is the final product of nitrification, it can accumulate in production systems with low water exchange, such as water recirculation systems. However, studies on the toxicity of this compound to marine fish are still scarce, and little is known about its effects on clownfish. Therefore, the present study had as objective to analyze the chronic effect of nitrate for juveniles of clownfish *A. ocellaris*. For this, the experiment had four treatments in triplicate, being three concentrations of nitrate 30, 60 and 90 mg / L, plus a control treatment without addition of nitrate. A total of 180 fish were randomly distributed in 12 tanks with a capacity of 15 L (15 fish / tank), 20 days after hatching (28.68 ± 1.09 mg and 12.09 ± 0.19 mm), constant aeration, photoperiod 12h / 12h (light / dark) and controlled temperature (27°C). The experiment lasted 42 days and at the end the zootechnical performance and the oxidative status of the whole fish were evaluated. There was no difference for parameters of survival and zootechnical performance, except for the condition factor K, however, there was an increase in TBARS (lipoperoxidation) and nonprotein Thiol (NPSH) in nitrate concentrations of 60 and 90 mg / L. This increase in non-protein thiol (NPSH), corroborates with GST (Glutathione S-Transferase) activity significantly lower at the same concentrations. However, no differences were observed for total capacity against a peroxy radical (ACAP) and protein thiol (PSH). Thus this study demonstrates the level of up to 30 mg / L of N-NO₃⁻ does not cause damage to the juvenile production of clownfish *A. ocellaris*.

Keywords: marine fish-farming, toxicity, oxidative stress.

1. Introdução

1.1. Aquicultura e piscicultura ornamental

A aquicultura compreende diversos sistemas de produção, operando nas áreas agrícolas terrestres, costeiras e marinhas, utilizando e produzindo uma grande variedade de espécies de animais e plantas (FAO, 2016). Em relação a um dos setores mais lucrativos desse segmento e que desperta interesse por parte de investidores, a criação de peixes ornamentais apresenta características bastante atraentes para o seu desenvolvimento quanto ao custo de implantação relativamente baixo quando comparado a espécies de corte. (TLUSTY, 2002). Mundialmente, o mercado de peixes ornamentais marinhos representa uma atividade bastante significativa em termos econômicos, sociais e ambientais (OLIVOTTO et al., 2003), e encontra-se em rápida evolução (RHYNE & TLUSTY et al., 2012). Embora seja aconselhável usar espécies nativas, a criação de peixes exóticos para fins ornamentais já é uma realidade, e portanto devem ser tomados cuidados para evitar problemas ambientais (TLUSTY, 2002).

No Brasil, os peixes-palhaço estão listados entre as espécies de peixes exóticas de águas marinhas permitidas à importação com finalidade comercial ou de aquariofilia, onde as normas, critérios e padrões para tal desígnio, seguem a instrução Normativa Ibama nº 202/2008, (IBAMA, 2017). Os peixes-palhaço são muito populares entre os aquariofilistas devido ao seu atrativo estético e sua facilidade de adaptação às condições de cativeiro (IGNATIUS et al., 2001), podendo servir como alternativa de renda para pequenos produtores e empreendedores (REZENDE, 2010; ALBÉ, 2006).

1.2. Peixe-palhaço

A Família Pomacentridae é composta por 30 espécies, 29 do gênero *Amphiprion* e apenas 1 do gênero *Premnas* (THORNHILL, 2012). A Subfamília Amphiprioninae, tem como característica o hermafroditismo protândrico (BUSTON, 2003). O falso peixe-palhaço *Amphiprionocellaris*, é nativo dos oceanos Índico e Pacífico, habitando recifes de corais e lagoas protegidas de até 15 metros de profundidade. A coloração laranja brilhante, com três bandas brancas delimitadas por listras pretas e 11 (raramente 10) espinhos na nadadeira dorsal são características dessa espécie (FAUTIN & ALLEN, 1992). O colorido corporal é um

dos atributos que mais chama a atenção, tornando-a uma espécie extremamente popular em aquários (THORNHILL, 2012). De simples cultivo e amplamente distribuído no mercado da aquarofilia (IGNATIUS et al., 2001; WITTERINCH, 2007), os peixes palhaços são considerados os peixes ornamentais marinhos mais importantes, tanto no aspecto extrativo, como no aspecto de produção, com alta demanda de mercado (FAUTIN & ALLEN, 1997; WABNITZ et al., 2003; IGNATIUS et al., 2001; RHYNE et al., 2012).

Apesar da elevada produção e de vários estudos sobre reprodução, larvicultura e nutrição (AVELLA et al., 2007; OLIVOTTO 2011; SIVA & HAQ 2017), ainda são escassas as pesquisas identificando os parâmetros ambientais ideais para a sua produção, principalmente com nitrogenados. Entretanto, Medeiros et al. (2016), relatam a toxicidade aguda de amônia e nitrito para *A. ocellaris*, evidenciando os valores a serem evitados e danos causados principalmente nas brânquias. Há apenas um estudo sobre o efeito do nitrato sobre peixe-palhaço, Frakes & Hoff (1982) demonstraram efeitos negativos desse composto sobre o desempenho e a coloração dos peixes. Entretanto, ainda não há relatos para esta espécie, relacionados aos efeitos do nitrato utilizando marcadores bioquímicos. Desse modo, considerando a importância da espécie, é importante conceber um sistema que possibilite sua produção, em diversos locais com biossegurança e bem-estar para aos animais produzidos.

1.3. Sistema de recirculação de água (RAS)

Nas últimas três décadas, com a intensificação dos sistemas de produção na aquicultura, o uso de sistemas de recirculação de água tem evoluído graças às pesquisas e produções comerciais que o utilizam em suas atividades (TIMMONS & EBELING, 2010), especialmente entre países que têm uma maior atenção na minimização de impactos ambientais (BADIOLA et al., 2012). Este evento se observa também na produção de peixes ornamentais, como sugerido em análises econômicas feitas sobre a produção de peixe-palhaço (KODAMA et al., 2011). Em decorrência desse progresso e subsequente diminuição da troca de água, resíduos de produtos nitrogenados se acumulam na água (VAN RIJN, 2013). Preocupações atuais sobre alterações ambientais justificam a necessidade de desenvolver sistemas de criação de peixes menos poluentes. Para tornar a produção mais responsável ambientalmente, sistemas de recirculação foram desenvolvidos a fim de reduzir o consumo de água e de melhorar a gestão dos resíduos (DAVIDSON et al., 2014), possibilitando cultivos próximos aos grandes centros de comercialização. Ainda

proporcionam um maior controle das variáveis abióticas, reduzem os riscos de escapes de espécies exóticas ou geneticamente modificadas para o meio ambiente (TIMMONS & EBELING, 2010).

Basicamente a tecnologia utilizada em sistemas de recirculação, envolve unidades de tratamento da água como sistema de filtração biológica e mecânica, eskimmer para remoção de resíduos, bem como esterilizadores ultravioleta para o controle de patógenos. No entanto, há muitas inovações técnicas necessárias para permitir que os sistemas operem com bom desempenho para uma gama mais ampla de animais, condições de produção e das diferentes fases da vida dos organismos (MARTINS et al., 2010). Recomenda-se que estes sistemas sejam projetados e construídos adequadamente para que funcionem de maneira eficiente, porém atendendo as necessidades de cada laboratório, produção e recurso disponível (BADIOLA et al., 2012; EBELING & TIMMONS, 2012).

A degradação biológica convencional de componentes de nitrogênio na água compreendem duas etapas principais, a nitrificação e desnitrificação. Dentro do processo de nitrificação, os biofiltros são utilizados nos sistemas de recirculação para evitar a acumulação de amônia, promovendo a rápida conversão ao nitrito e posteriormente ao nitrato, que é o composto nitrogenado final desse processo (EBELING & TIMMONS, 2012). A oxidação da amônia a nitrito pode ser realizada por bactérias do gênero *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, e *Nitrosovibrio*, já a oxidação do nitrito a nitrato por bactérias do gênero *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, e *Nitrospina* (BARTELME et al., 2017). Entretanto, não há remoção do nitrato por esse mecanismo, tendendo este a acumular-se no sistema. A remoção é possível por meio da desnitrificação, redução do nitrato para o nitrogênio gasoso através de diferentes métodos (RIJIN et al., 2006; MOUSAVI et al., 2012; NGUYEN et al., 2015). As técnicas de remoção envolvem processos abióticos e bióticos, entre eles, alguns métodos de troca iônica, electrodiálise, adsorção de carvão ativado, bem como tratamentos microbianos e sistemas aquapônicos (GROMMEN et al., 2006; MOUSAVI et al., 2012; HUNDLEY & NAVARRO, 2013). Na aquicultura alguns modelos podem ser vinculados ao RAS, como o reator de enxofre (RE), elemento que funciona como doador de elétrons para a redução do nitrato, a qual é realizada por bactérias autotróficas (KUI E VERSTRAETE, 1999); outro que também vem sendo utilizado é o sistema aquapônico, uma modalidade de cultivo de alimentos que envolvem a integração entre a aquicultura e a hidroponia em sistemas de recirculação de água e nutrientes (HUNDLEY & NAVARRO, 2013).

1.4. Nitrato e seus efeitos

O nitrato (NO_3^-) produto final do processo de nitrificação, (TOMASSO, 1994), ao contrário da amônia e nitrito já foi considerado por parte de pesquisadores, uma substância com pouco ou nenhum poder tóxico, alguns até afirmam que a ausência de efeitos fisiológicos importantes está relacionado à baixa toxicidade na maioria de organismos aquáticos (JENSEN, 1996; THURSTON et al. 1978; VAN RIJIN, 1996), no entanto, pode acumular-se em grandes quantidades quando não há desnitrificação em sistema de recirculação de água, que opera com trocas mínimas de água e/ou altas taxas de alimentação (DAVIDSON et al., 2017). Os mecanismos de toxicidade do nitrato para peixes, são principalmente devido ao seu efeito sobre a osmorregulação e possivelmente pelo transporte de oxigênio (CAMARGO et al., 2005). Apesar de não estarem totalmente elucidadas as vias de assimilação do nitrato em peixes, alguns mecanismos de toxicidade são sugeridos. A assimilação através das brânquias é o mais reportado, porém devido à baixa permeabilidade dessas ao nitrato, a aceitação é limitada e outros mecanismos são sugeridos e relacionados à absorção do nitrito, como por exemplo a possível assimilação transdérmica de nitrato no trato gastrointestinal. (GROSELL E JENSEN, 2000; STORMER et al., 1996; VAN BUSSEL et al., 2012). No entanto alguns estudos vêm sendo realizados e demonstram que concentrações elevadas de nitrato tem o potencial de levar à asfixia, hiperventilação, letargia podendo afetar o crescimento dos animais cultivados e morte por hiperplasia, além de perturbar a função endócrina e induzir respostas de estresse nos organismos produzidos (CAMARGO et al., 2005; HAMLIN, 2006; HAMLIN et al., 2008; VAN RIJIN et al., 2006).

Os níveis seguros de nitrato e seus efeitos em vários estágios de desenvolvimento de diferentes organismos aquáticos ainda não estão bem estabelecidos. Alguns estudos de toxicidade aguda recomendam que concentrações de nitrato para peixes marinhos devam ser inferiores a 500 mg/L de $\text{NO}_3^- \text{N/L}$ (PIERCE et al., 1993). Entretanto para CAMARGO et al., (2005) um nível máximo de 20 mg/L pode em geral ser aceitável na criação de organismos aquáticos marinhos. Porém a toxicidade do nitrato pode variar de acordo com a espécie, uma vez que depende de variáveis tais como o tamanho do animal, tempo de exposição, salinidade e adaptação ambiental (CAMARGO et al., 2005; HAMLIN, 2006; TSAI e CHEN, 2002). As informações sobre toxicidade de nitrato em peixes marinhos cultivados em RAS, ainda são limitadas, principalmente com efeito crônico, devido à insuficiência de estudos experimentais, os níveis de segurança reportados são valores teóricos calculados a partir de dados de

toxicidade aguda ou baseados na experiência rotineira na aquicultura (FRAKES & HOFF, 1982; VAN BUSSEL et al., 2012)

Em estudo com truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, Davidson et al. (2014) observaram que as baixas trocas de água em sistemas de recirculação permitiram a acumulação média de nitrato de 100 mg NO₃⁻N/L. Seria essa uma causa potencial de comportamentos anormais de natação para essa espécie. Esse comportamento também foi observado por Poersch et al. (2007) para juvenis da tainha *Mugil platanus* expostos ao nitrato, além de mudanças em sua coloração. Em se tratando de piscicultura ornamental, alterações na coloração podem representar uma perda econômica, visto que a cor é atrativa para quem contribui com esse tipo de comércio/atividade. Frakes & Hoff (1982) notaram que juvenis do peixe-palhaço (*A. ocellaris*) expostos a nitrato, apesar de não terem sua sobrevivência afetada, tiveram o seu crescimento reduzido, bem como alterações na sua coloração, o que pode representar um problema para a comercialização da espécie e gerar perda econômica.

Os ensaios de toxicidade aguda são de curto prazo (24-96 h), entretanto experimentos de exposição subletais, comumente exigem de 30 a 90 dias para organismos aquáticos (COLT, 2006). Estudos têm demonstrado que a exposição ao nitrato pode causar níveis diferentes de toxicidade aguda e crônica, numa grande variedade de espécies aquáticas (CAMARGO e ALONSO, 2006; VAN BUSSEL et al., 2012) e que o fato de uma substância química não produzir efeitos visíveis sobre esses organismos em testes de toxicidade aguda, não indica que ela não seja tóxica para eles (LI et al., 2015), por isso é importante avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas (GUPTA, 2016; LI et al., 2015) em concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, entretanto possam afetar suas funções biológicas.

1.5. Estresse oxidativo

Geralmente disfunções fisiológicas, alterações estruturais e mudanças comportamentais que podem comprometer o crescimento e a reprodução, são as implicações que mais se observam em peixes quando expostos a poluentes (ADAMS, 1994). A avaliação do potencial tóxico de compostos químicos pode ser realizada através de biomarcadores bioquímicos, os quais podem permitir a identificação de sinais iniciais de estresse nos organismos (LOPES et al., 2001; VAN DER OOST et al., 2003; WANG, 2009). Neste contexto, a avaliação de parâmetros referentes ao sistema de defesa antioxidante e de dano

oxidativo podem ser uma ferramenta útil para se determinar os efeitos tóxicos de contaminantes ambientais (LUSHCHAK, 2011).

Durante o processo de respiração aeróbica, parte do oxigênio metabolizado para produção de ATP resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) como o ânion radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), as quais possuem capacidade de oxidar macromoléculas, comprometendo assim suas funções e os processos biológicos envolvidos (GUTTERIDGE, 1995; LYKKESFELDTESVENDSEN, 2007). Para se proteger da ação das EROS, os organismos aeróbicos apresentam um sistema antioxidante composto de defesas enzimáticas e não enzimáticas (LOPESet al., 2001). Dentre as enzimas com papel antioxidante podemos mencionar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione reductase (GR) e a glutathione S-transferase (GST) (BAGNYUKOVA et al., 2007). Já os antioxidantes não enzimáticos envolvem diversas moléculas, tais como a glutathione reduzida (GSH), os flavonoides, o ácido ascórbico, o α -tocoferol, o β -caroteno e o ácido lipóico (LYKKESFELDT E SVENDSEN, 2007).

Os agentes pró-oxidantes e os antioxidantes em condições fisiológicas normais dos organismos encontram-se em um estado de equilíbrio. O estresse oxidativo pode ser definido quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, em favor dos oxidantes, ou em detrimento da velocidade de remoção desses, resultando no aumento dos níveis de dano oxidativo em macromoléculas, como proteínas, lipídios, DNA e RNA (LUSHCHAK, 2011; HALLIWELL & GUTERIDGE, 2015). Dependendo do grau desse desequilíbrio, o dano oxidativo pode comprometer diversas funções fisiológicas, e até mesmo ocasionar morte celular por apoptose ou necrose (JONES, 2006; LYKKESFELDT 2007; HALLIWELL & GUTERIDGE, 2015).

Já foi demonstrado que a exposição a contaminantes como compostos nitrogenados incluindo a amônia e o nitrito induzem o estresse oxidativo, uma vez que podem levar a diminuição da eficácia do sistema de defesa antioxidante dos peixes e/ou elevar a produção de agentes oxidantes como as EROS e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (SINHA et al., 2014; JENSEN et al., 2015; LI et al., 2016; MALTEZ et al., 2017). Apesar destes efeitos ainda não terem sido descritos em peixes expostos ao nitrato, vale mencionar que parte do nitrato que é absorvido pelos peixes pode ser reduzido a nitrito pela ação da nitrato reductase (SCHRAM et al., 2012). Esta pode ser então uma possível via de indução ao estresse oxidativo em peixes mantidos em concentrações de nitrato acima dos níveis adequados.

Na produção animal, o estresse oxidativo pode estar envolvido em várias condições patológicas, incluindo condições relevantes para o bem-estar geral dos indivíduos (LYKKESFELDT et al., 2007; MALTEZ et al., 2017).Entretanto, ainda não há na literatura, estudos que avaliem os efeitos no sistema de defesa antioxidante e níveis de dano oxidativo em peixes-palhaços expostos ao nitrato. Desta forma, as informações obtidas neste estudo poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos de toxicidade do nitrato,bem comono estabelecimento decritérios de qualidade de água e manejo adequado nos sistemas de produção.

2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito crônico do nitrato em juvenis do peixe-palhaço *Amphiprionocellaris*.

3. Objetivos específicos

- Examinar o efeito crônico do nitrato sobre a sobrevivência e parâmetros zootécnicos em juvenis do peixe-palhaço *A. ocellaris*;
- Avaliar os efeitos da exposição a concentrações subletais de nitrato no sistema de defesa antioxidante e nos níveis de dano oxidativo em juvenis do peixe-palhaço (*A. ocellaris*).

4. Material e Métodos

4.1 Desenho experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, atendendo aos requisitos exigidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal CEUA/FURG, sob certificado de N° 23116.008568/2017-23.

Os juvenis de peixe-palhaço foram produzidos no LAPEM a partir de protocolos de reprodução e larvicultura de acordo com Hoff (1996). Onde após o período de incubação dos ovos realizado no próprio sistema de reprodutores com o cuidado parental, os ovos são transferidos para tanques circulares de 20 L e mantidos em sistemas semi-estático, com renovações diárias progressivas que vão de 5 a 80%, conforme o decorrer da larvicultura. Durante o período larval se utiliza água verde através da inoculação da microalga *N. oculata* do 1-10 dia após a eclosão (DAE), rotíferos *B. plicatilis* (10-15 por ml) do 1-5 DAE, náuplios de artêmia AF (325-400 µm) INVE Aquaculture, do 3 -5 DAE, náuplios de artêmia (5-10 por ml) (>425 µm) do 4-7 DAE, metanáuplios enriquecidos (RED PEPER) por 24 h do 7-15 DAE (5/ml), rações (ORANGE GROW) de diferentes diâmetros a partir do 10 DAE, até o início do experimento.

Aos 20 DAE, 180 peixes (peso médio de 28,68±1,09 mg e comprimento total de 12,09±0,19 mm) foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques cilíndricos com volume útil de 15 L, parede preta e fundo branco, mantidos em um banho termostatizado para controle da temperatura, com aeração proveniente de um soprador e regulada através de pedras de aeração, fotoperíodo de 12:12h (claro:escuro) e densidade de estocagem de 1 peixe/L (15 peixes por unidade).

Os peixes foram expostos a três concentrações de nitrato, mais um controle sem nitrato (0, 30, 60 e 90 mgN-NO₃⁻/L), todos em triplicata, por um período de 42 dias. As concentrações de nitrato foram obtidas com adição de nitrato de sódio (NaNO₃-Synth, Brasil) previamente diluído.

Foram realizadas biometrias no início e no final do experimento para avaliação dos índices de desempenho zootécnico. Ao final dos 42 dias também foram coletados cinco peixes inteiros para análises de estresse oxidativo ($n= 15$ animais/tratamento). Após eutanásia em dose letal de hidrocloreto de benzocaína (300 ppm) os peixes destinados a avaliação bioquímica, foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80° C) até a realização das análises.

4.2. Qualidade de água e manejo dos animais

Os parâmetros de qualidade da água foram controlados diariamente pela manhã. A temperatura e oxigênio dissolvido foram medidos com oxímetro digital - (YSI Model 550A- Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EUA), a salinidade com refratômetro digital (ATAGO, PAL-06S, Japão), o pH com pHmetro de bancada (METTLER TOLEDO FiveEasy FE20, Suíça). As análises de amônia total (NAT) seguiu metodologia já descrita (UNESCO, 1983), assim como para nitrito (BENDSCHNEIDER AND ROBINSON, 1952), ambas lidas em espectrofotômetro (BioespectroSP-22), e alcalinidade foi medida por titulometria (EATON et al., 2005). A temperatura foi mantida em $27,0^{\circ}$ C, a concentração de oxigênio dissolvido em $6,80$ mg O_2 /L, o pH em $8,27$, alcalinidade em $199,59$ mg $CaCO_3$ /L, salinidade 30 ‰, amônia total $0,26$ mg N-NAT/L e nitrito $0,19$ mg N- NO_2^- /L.

A cada 5 dias foram realizadas análises de nitrato adotando metodologia descrita em Baumgarten et al. (2010), para a aferição das concentrações pré-estabelecidas. A renovação de água das unidades experimentais foi realizada inicialmente a uma taxa de 50% do seu volume ao dia. A partir do décimo quinto dia de experimento a taxa foi ajustada para 80% devido ao crescimento dos animais e aumento dos níveis de excreção de amônia. Durante todo o experimento, a água utilizada para renovação foi proveniente de soluções estoques, previamente preparadas para cada concentração de nitrato. Os animais foram alimentados três vezes ao dia (9h, 13h e 17h) com ração comercial para larvas e juvenis de peixe marinho, até a saciedade aparente durante todo o período experimental, exceto no dia anterior a coleta.

4.3. Análises

Para a biometria inicial, utilizou-se um grupo representativo de 30 animais que seriam utilizados no experimento. Após 42 dias do experimento, todos os peixes foram mantidos em

jejum de 24h e anestesiados com hidrócloridrato de benzocaína (75 ppm). O comprimento total (CT) e o peso dos animais foram obtidos com a utilização de paquímetro e balança (Sartorius 129 TE214S, Brasil) com 0,0001g de precisão respectivamente. A performance dos peixes no experimento foi avaliada através dos seguintes índices zootécnicos:

- **Sobrevivência:** $S(\%) = (n^\circ \text{ final de peixes}) \div (n^\circ \text{ inicial de peixes}) \times 100$.
- **Taxa de crescimento específico (TCE):** $TCE (\%) = 100 \times [(\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso Inicial (g)}) \div \text{tempo (dias)}]$.
- **Conversão alimentar aparente (CAA):** $CAA(\%) = (\text{Ração ofertada}) \div (\text{Ganho de biomassa}) \times 100$.
- **Fator de condição de Fulton (K):** $(\text{Peso total}) \div (\text{Comprimento total}^3) \times 100$.
- **Ganho de Peso (GP):** $\text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$.

4.3.1. Bioquímica (Estresse oxidativo)

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA) da FURG. Cinco peixes inteiros de cada tanque foram homogeneizados em sonicador (QSonica, LLC. Modelo: Q55, EUA) (diluição 1:4 – p:v) em Ice- Cold buffer (100 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA e 0,1% triton X-100 (v/v), pH 7,8) como descrito por CASTRO et al. (2012) e então centrifugados a 10.000 ×g durante 30 minutos a 4 °C (Centrífuga SOLAB SL-703, Brasil). O sobrenadante foi pipetado e estocado a -80 °C até a realização das análises.

O conteúdo de proteínas totais dos homogeneizados foi determinado pelo método de biureto, utilizando kit comercial (Dole, Brasil). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofluorímetro (BioTek, Synergy HT, EUA) à 550 nm. A capacidade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP) foi mensurada de acordo com a metodologia descrita por Amado et al. (2009). Para tal, as amostras foram previamente padronizadas em 2mg/ml de proteínas totais e lidas em excitação (485nm) e emissão (520nm) (Bio Tek, Synergy HT, EUA). Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram medidos de acordo com OAKES & VAN DER KRAAK (2003). Este método quantifica os níveis de malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica, medindo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) realizando medições fluorimétricas à excitação de 520 nm e emissão de 580 nm (Bio Tek, Synergy HT, EUA) e os resultados foram expressos como nmol TMP mg de tecido úmido⁻¹, onde TMP representa tetrametoxipropano (ACROS Organics), empregado como padrão. A atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) foi obtida da leitura

em absorvância (340 nm) (BioTekSynergy HT, EUA) segundo Habig (1974) e Habig&Jakoby (1981). O método empregado para a detereminação do conteúdo de tióisprotéicos (PSH) e não protéicos (NPSH) utilizou DTNB (5,5- ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico, Sigma), conforme proposto por Sedlak e Lindsay (1968). A determinação do teor de NPSH nas amostras foi medida após a desproteínização com ácido tricloroacético (TCA 50%). O pellet formado pela proteína precipitada foi ressuspendido com tampão de homogeneização para quantificação do teor de PSH lido aabsorbânciade 405nm(BioTekSynergy HT, EUA).

4.3.2.Estatística

Todos os dados obtidos tiveram os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene) avaliados. Se pelo menos um destes requisitos não foi atendido, aplicou-se transformações matemáticas. Uma vez atendido estes pressupostos, os dados foram submetidos à ANOVA de uma via e, quando houve diferenças estatísticas significativas detectadas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado quando os dados apresentavam distribuição não normal ou não homogênea. Todas as análises foram realizadas com um nível mínimo de significância de 5% ($P < 0,05$) (ZAR, 1996).

5. Resultados

5.1. Desempenho zootécnico

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho zootécnico avaliados exceto o fator de condição (K) que apresentou valores significativamente mais elevados nos peixes expostos a 90 mg N-NO₃⁻/L quando comparado aos demais grupos experimentais. (Tabela 2).

Tabela 2- Parâmetros zootécnicos (média±EP) de juvenis de peixe palhaço *Amphirionocellaris* criados em diferentes concentrações de nitrato por 42 dias.

	Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)			
	0	30	60	90
Peso inicial(mg)	28,68±1,09			
Peso final (mg)	214,23±3,96	201,69±21,78	188,39±18,79	195,89±6,52
CT inicial (mm)	12,09±0,19			
CT final (mm)	22,15±0,06	22,04±0,75	21,06±0,83	20,51±0,33
Sobrevivência	100±0,00	86,67±13,33	95,56±2,22	100±0,00
K	1,97±0,04 ^b	1,87±0,01 ^b	2,01±0,05 ^b	2,27±0,04 ^a
CAA	1,18±0,08	1,21±0,04	1,19±0,09	1,12±0,11
TCE	4,79±0,04	4,63±0,26	4,46±0,23	4,57±0,08

CT: Comprimento total; K: Fator de condição;CAA: Conversão alimentar aparente. TCE: Taxa de crescimento específico. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatística significativas entre os tratamentos (Tukey $p < 0,05$).

5.2. Parâmetros bioquímicos

O teor de proteínas totais foi significativamente menor nos juvenis de peixe-palhaço expostos a 90 mg/L de N-NO_3^- em relação aos peixes do grupo controle (Figura 1).

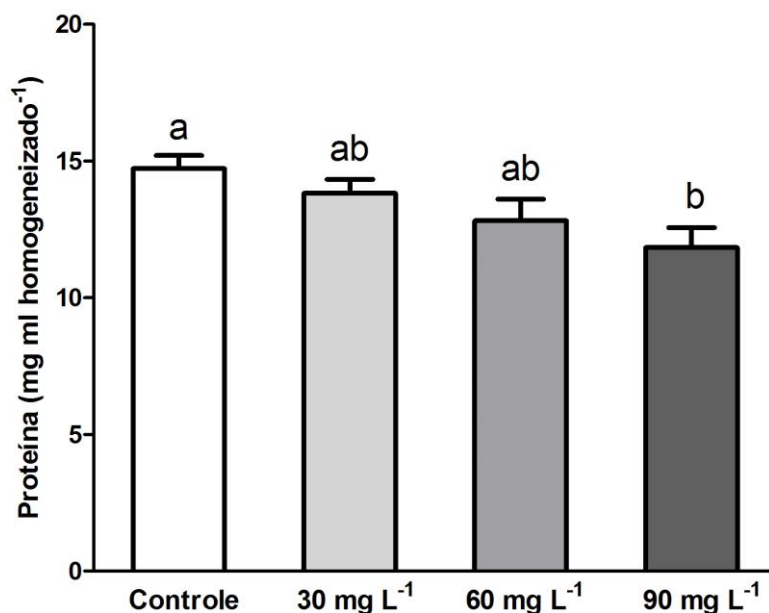


Figura 1- Conteúdo proteico em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprionocellaris* expostos a diferentes concentrações de nitrato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. (Tukey; $p < 0,05$)

A atividade da GST foi menor no tratamento 60 mg/L de N-NO_3^- em relação ao controle, e no tratamento 90 mg/L de N-NO_3^- em relação ao controle e ao tratamento 30 mg/L de N-NO_3^- (Figura 2). A ACAP (Figura 3) e os níveis de PSH (Figura 4) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Foi observado um aumento nos níveis de NPSH (Figura 5) e TBARS (Figura 6) nos peixes expostos a 60 e 90 mg/L de N-NO_3^- em relação ao tratamento controle.

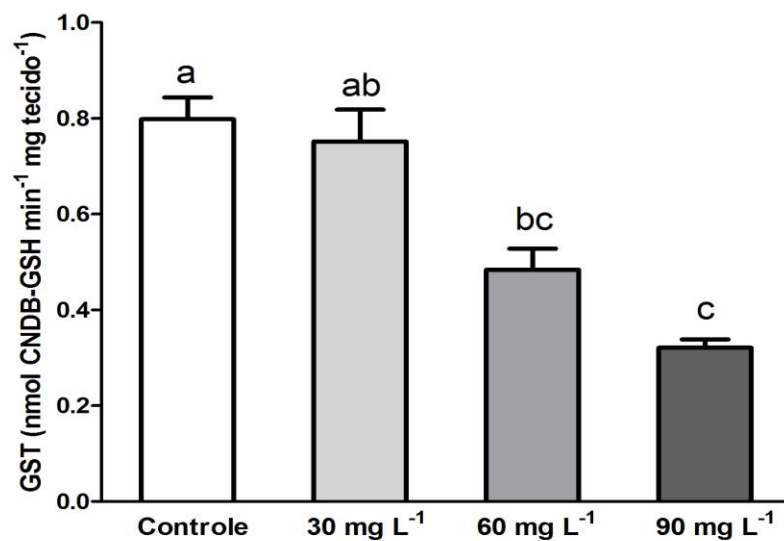


Figura 2- Atividade da Glutathiona S-transferase (GST) em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprionocellaris* expostos a diferentes concentrações de nitrato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.(Kruskall-Wallis;p <0,05).

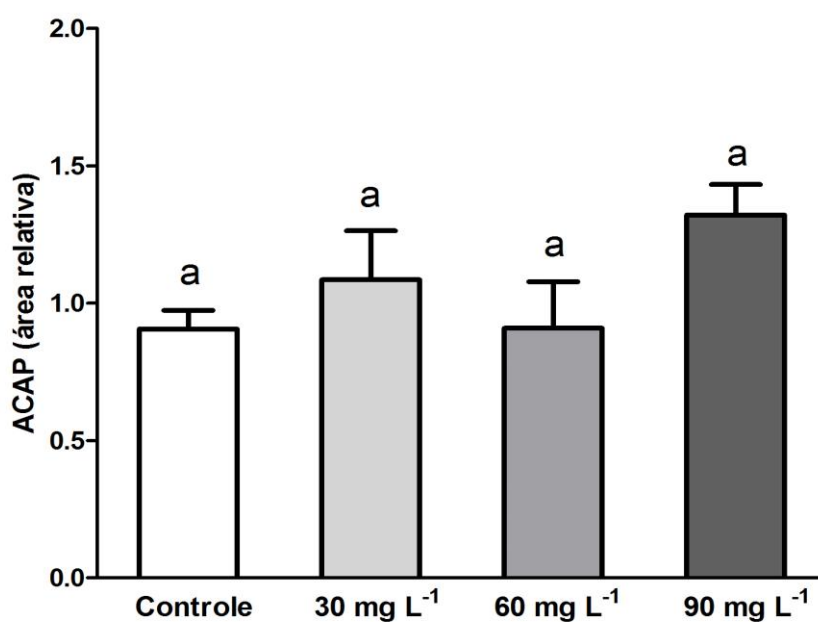


Figura 3- Capacidade antioxidante total frente a um radical peroxil (ACAP) em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprionocellaris* expostos a diferentes concentrações de nitrato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. (Kruskall-Wallis; p <0,05).

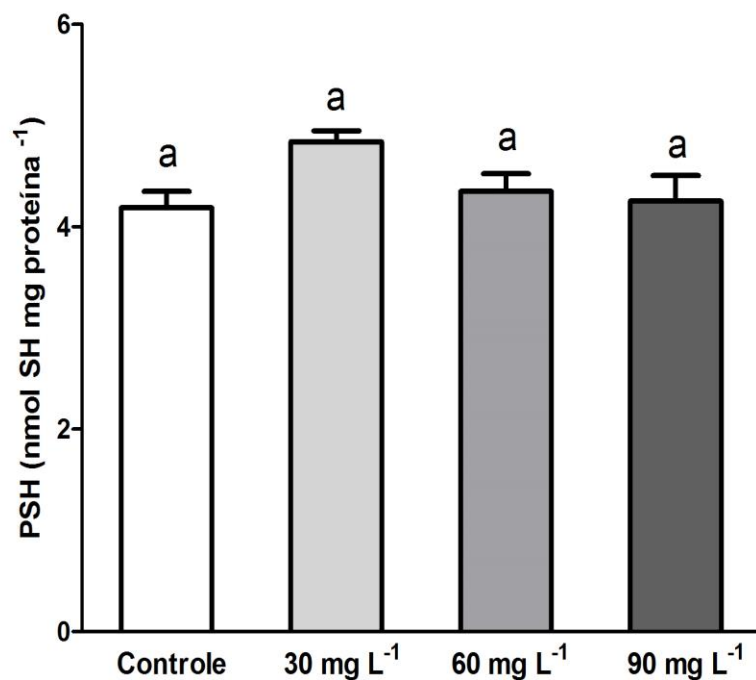


Figura 4- Tiol proteico (PSH) contido em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprionocellaris* expostos a diferentes concentrações de nitrato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. (Tukey; $p < 0,05$).

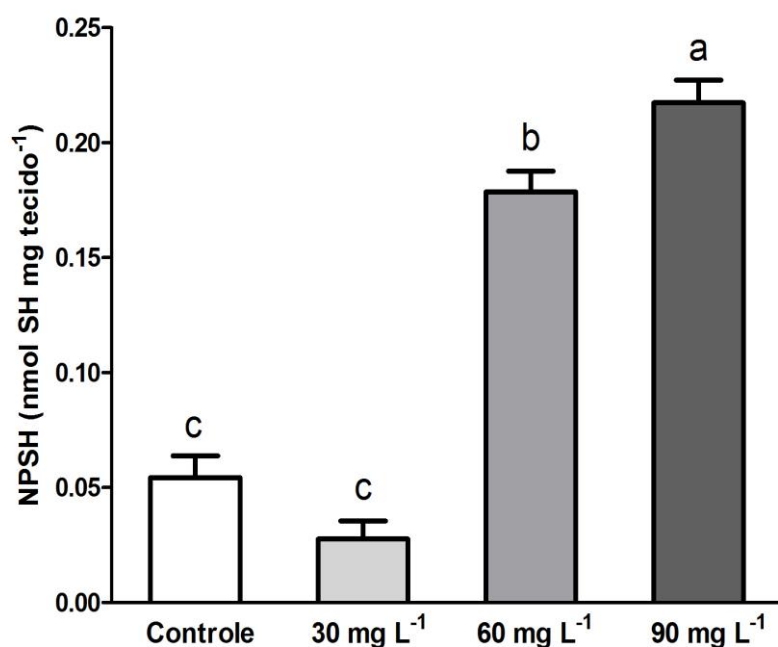


Figura 5- Tiol não proteico (NPSH) contido em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprionocellaris* expostos a diferentes concentrações de nitrato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. (Tukey; $p < 0,05$).

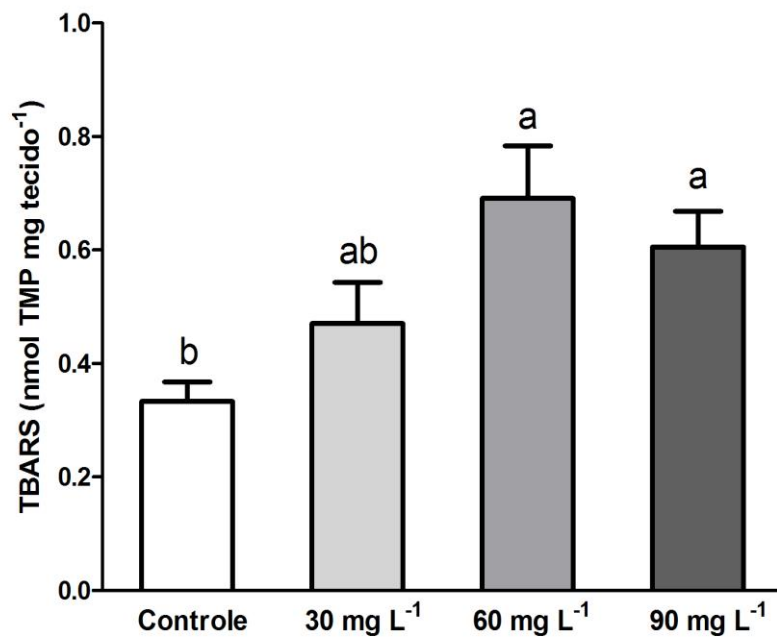


Figura 6- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) contido em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprionocellaris* expostos a diferentes concentrações de nitrato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.(Kruskall-Wallis; $p < 0,05$).

6. Discussão

O nitrato é um parâmetro de qualidade da água que requer atenção em sistemas de produção que utilizam filtros biológicos, como os sistemas de recirculação de água, por exemplo, sobretudo quando não há remoção do nitrato acumulado no sistema. No entanto, os seus efeitos não foram extensivamente estudados para a maioria das espécies cultivadas nesses sistemas (DAVIDSON et al., 2017).

No presente estudo, o desempenho zootécnico dos juvenis de peixe-palhaço não foi comprometido, resultado semelhante foi observado em larvas de zebrafish *Danio rerio* expostas às concentrações de 50 a 200 mg/L de N-NO_3^- durante 23 dias (LEARMONTH & CARVALHO 2015). No entanto, juvenis do *A. ocellaris* expostos às concentrações de 100 mg/L de N-NO_3^- durante 84 dias têm um crescimento reduzido (Frakes & Hoff, 1982). Em nosso delineamento com metade do período experimental, os dados do fator de condição, maior na concentração de 90 mg/L de N-NO_3^- sugere um aumento do peso em relação ao comprimento, que pode expor uma diferença de crescimento em um período mais prolongado. Apesar da ausência de efeitos evidentes sobre o desempenho zootécnico, os resultados dos parâmetros bioquímicos demonstram que concentrações a partir de 60 mg/L de N-NO_3^- são suficientes para causar estresse nos juvenis do *A. ocellaris*.

Segundo Thomas (1990), os efeitos metabólicos desencadeados pelo estresse incluem alterações bioquímicas e fisiológicas como a inibição da síntese proteica. Este fato foi observado no teor de proteínas totais menor dos juvenis de peixe-palhaço expostos a 90 mg/L de N-NO_3^- , sugerindo uma inibição da síntese proteica ou sua utilização para suprir uma maior demanda energética desencadeada pelo estresse.

Alguns autores relatam que compostos nitrogenados como amônia e nitrito induzem o estresse oxidativo nos tecidos de peixes uma vez que podem levar a uma maior geração de radicais livres e/ou inibição do sistema de defesa antioxidante, causando assim o aumento nos níveis de dano oxidativo em diferentes macromoléculas e tecidos (SUN et al., 2014; JIA et al., 2015; LI et al., 2016; MALTEZ et al. 2017).

Os juvenis de peixe palhaço expostos a concentrações a partir de 60 mg/L de N-NO_3^- apresentaram uma inibição da atividade da GST, que é um grupo de enzimas que catalisa a reação de moléculas eletrofílicas com a glutatona reduzida (GSH), apresentando assim um importante papel como antioxidante e na detoxificação de xenobióticos e produtos de dano

oxidativo (BLANCHETTE et al. 2007). Este resultado indica o efeito negativo do nitrato sobre o sistema de defesa antioxidante enzimático e que se demonstrou mais acentuado na concentração mais alta de nitrato (90 mg/L de $N-NO_3^-$). Neste tratamento houve uma concomitante redução no conteúdo de proteínas totais, sugerindo uma possível relação entre estes parâmetros, já que uma inibição da síntese proteica poderia comprometer a ação da enzima. Porém não foram demonstrados efeitos do nitrato sobre a ACAP dos juvenis de peixe-palhaço indicando que de modo geral a competência dos organismos em se proteger contra os radicais oxidativos foi mantida.

Nas concentrações 60 e 90 mg/L de $N-NO_3^-$ também foi observado um aumento no conteúdo de NPSH. A GSH é o NPSH predominante nas células (DICKINSON & FORMAN, 2002), portanto, a diminuição da atividade da GST nestes mesmos tratamentos, pode levar a uma menor utilização de GSH, justificando o aumento reportado. Outra via de explicação pode estar relacionada ao papel da GSH na detoxificação de compostos nitrogenados. De acordo com Monsees et al., (2016) uma das rotas sugeridas de detoxificação do nitrato envolve a sua redução a nitrito (NO_2^-). A GSH é citada como uma das mais importantes moléculas que detoxificam o NO_2^- (DOBLANDER & LACKNER, 1996) e a sua síntese pode ser regulada positivamente em resposta ao acúmulo deste composto no organismo (MOELLERING et al., 1998).

Os teores de PSH podem ser utilizados como indicadores dos níveis de oxidação proteica (MITTON ET AL., 2016), os quais não se alteraram no presente estudo, apesar do cenário pró-oxidante induzido pela exposição ao nitrato. Este resultado pode estar relacionado ao aumento nos teores de NPSH, e possivelmente GSH, a qual através do processo denominado de S-glutathionilação previne a oxidação irreversível de proteínas (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2015).

Por outro lado, o aumento dos níveis de TBARS nos peixes expostos a concentrações a partir de 60 mg/L de $N-NO_3^-$ indicam o aumento no grau de LPO, uma reação em cadeia iniciada por um radical hidroxila que leva a oxidação sobretudo de ácidos graxos poli-insaturados (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2015). Uma vez que a ACAP não foi afetada, o aumento nos níveis de LPO sugerem uma maior produção de pró-oxidantes induzida pelo nitrato. Além disso, a inibição da atividade da GST observada nas mesmas concentrações (60 e 90 mg/L de $N-NO_3^-$) também pode explicar o aumento nos níveis de TBARS, uma vez que esta enzima apresenta um papel importante na detoxificação de produtos de dano oxidativo, incluindo o MDA.

7. Conclusão

Não há diferenças significativas no desempenho zootécnico dos peixes expostos as concentrações de 30, 60 e 90 mg/L de N-NO_3^- , exceto para o fator de condição K na maior concentração, porém peixes expostos às duas maiores concentrações tem seu metabolismo oxidativo alterado. Portanto a produção de juvenis de *A. ocellaris* é segura até 30 mg/L de N-NO_3^- , pois até essa concentração não há problemas relacionados a sobrevivência, crescimento ou respostas de estresse oxidativo.

8. Referências Bibliográficas

- ADAMS, S. M. & RYON M. G. 1994. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 3: 15-25.
- ALBÉ, M. Q. 2006. Alguns indicadores de sustentabilidade para os pequenos e médios produtores rurais do município de Jaquirana. Universidade Luterana do Brasil – ULBRA. Disponível em: <http://docplayer.com.br/16515099-Alguns-indicadores-de-sustentabilidade-para-os-pequenos-e-medios-produtores-rurais-do-municipio-de-jaquirana-maristela-de-quadros-albe-1.html>. Acesso em: 20 Dezembro. 2017.
- AMADO, LL, ML GARCIA, PB RAMOS, RF FREITAS, B ZAFALON, JLR FERREIRA, JS YUNES, JM MONSERRAT. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.*, 407: 2115–212.
- AVELLA, M. A; OLIVOTTO, I; GIOACCHINI, G; MARADONNA, F; CARNEVALI, O. 2007. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish. *Amphiprionocellaris Aquaculture* 273:87-95.
- BADIOLA M, MENDIOLA D & BOSTOCK J 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: main issues on management and future challenges, *Aquacultural Engineering* 51, pp. 26-35.
- BAGNYUKOVA, T. V; LUSHCHAK, O. V; STOREY, K. B; LUSHCHAK, V. I. 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. *J Therm Biol.* 32:227-234.

- BARTELME, R. P; MCLELLAN, S. L; NEWTON, R. J. 2017. Freshwater Recirculating Aquaculture System Operations Drive Biofilter Bacterial Community Shifts around a Stable Nitrifying Consortium of Ammonia-Oxidizing Archaea and ComammoxNitrospira. In Front Microbiol, v.8: 101. Doi: 10.3389 / fmicb.2017.00101
- BAUMGARTEN, M.G. Z; ROCHA, J. M. B; NIENCHESKI, L. F. H. 2010. Manual de Análises em Oceanografia Química. Editora da FURG. Rio Grande, RS. 5: 118-128 p.
- BENDSCHNEIDER, K; ROBINSON, R. J. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. JMar Res 11:87–96.
- BLANCHETTE, B; FENG, X; SINGH, B. R. 2007. Marine glutathione S-transferases. Mar.Biotechnol., 9, 513-542.
- BUSTON, P. 2003.Social hierarchies: Size and growth modification in clownfish, brief communications in Nature, 424: 145-146.
- CAMARGO, J.A; ALONSO, A; SALAMANCA, A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. Chemosphere, 58: 1255 - 1267.
- CAMARGO, J. A e ALONSO, A. 2006. Ecological and Toxicological Effects of Inorganic Nitrogen Pollution in Aquatic Ecosystems: A Global Assessment. EnvironmentInternational, 32: 831-849.
- CASTRO, C, A PÉREZ-JIMÉNEZ, I GUERREIRO, H PERES, M CASTRO-CUNHA, A OLIVA-TELES. 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.
- COLT, J. 2006. Water quality requirements for reuse systems.Aquacultural Engineering 34: 143–156.
- DAVIDSON, J; GOOD, C; WELSH, C; SUMMERFELT, S. T. 2014. Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. Aquacult. Eng., 59: 30-40.
- DAVIDSON, J; GOOD, C; WILLIAMS, C; SUMMERFELT, S. T. 2017. Evaluating the chronic effects of nitrate on the health and performance of post-smolt Atlantic salmon *Salmo salar* in freshwater recirculation aquaculture systems. Aquacultural Engineering, 79: 1–8.
- DICKINSON, D. A; FORMAN, H. J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem. Pharmacol., 64: 1019-1026.

- DOBLANDER, C, R LACKNER. 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1289: 270-274.
- EATON, A. D; CLESCERI, L. S; RICE, E.W; GREENBERG, A. E. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21stedn. American Public Health Association, Washington, D.C.
- EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., 2012. Recirculating aquaculture systems, in: Tidwell, J. (Ed.), *Aquaculture Production Systems*. John Wiley & Sons, pp 245-277.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. Fisheries and Aquaculture Department. <http://www.fao.org>. Accessed 13 December 2017.
- FAUTIN, D.G; ALLEN, G.R. 1992. Anemonefishes and their host sea anemones. Western Australian Museum, Perth, 160 p.
- FRAKES, T. AND HOFF, JR, F.H.1982. Effect of high nitrate-N on the growth and survival of juvenile and larval anemonefish, *Amphiprionocellaris*. *Aquaculture*, 29: 155-158.
- GROMMEN, R; VERHAEGE, M; VERSTRAETE, W. 2006. Removal of nitrate in aquaria by means of electrochemically generated hydrogen gas as electron donor for biological denitrification. *Aquacultural Engineering*, 34: 33–39.
- GROSELL, M; JENSEN, F. B. 2000. Uptake and effects of nitrite in marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology*, 50: 97–107.
- GUTTERIDGE, J.M. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.*, 41:1819-1828.
- HABIG, W. H; PABST, M. J; JAKOBY, W. B. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130–7139.
- HABIG, W. H; JAKOBY, W. B 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.*, 77:398–405.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. Oxford University Press, USA. 905 p.
- HAMLIN, H. J. 2006. Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenserbaeri*). *Aquaculture*, 253: 688-693.
- HAMLIN, H. J; MOORE, B. C; EDWARDS, T. M; LARKIN, I. L.V; BOGGS, A; ALTA, W. J; MAIN, K. L; L. J. 2008. Nitrate-induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenserbaeri*) in commercial aquaculture. *Aquaculture*, 281: 118-125.
- HOFF JR, F.H. 1996. *Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clowfish*. 1^o ed. Aquaculture Consultants Inc. Dade City. 212p.

- HUNDLEY, G. C & NAVARRO, R. D. 2013. Aquaponia: a integração entre piscicultura e hidroponia. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 3(2): 52-61.
- IGNATIUS, B; RATHORE, G; JAGDIS, I; KANDASAMI, D; VICTOR, A.C.C. 2001. Spawning and larval rearing technique for tropical clownfish *Amphiprionsebae* under captive conditions. *J. Aquac. Trop.*, 16 (3):241-249.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA), 2017. Instrução normativa Nº 202, de 22 de outubro de 2008. Dispõe sobre normas, critérios e padrões para a exploração com finalidade ornamental e de aquariofilia de peixes nativos ou exóticos de águas marinhas e estuarinas. Em: www.ibama.gov.br/biodiversidadeaquatica/aquariofilia/legislacao
- JENSEN, F. B. 1996. Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacustacus*). *Aquatic Toxicology*, 34: 95-104.
- JENSEN, F.B; GERBER, L; HANSEN, M.N; MADSEN, S.S. 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. *J. Exp. Biol.*, 218: 2015-2022.
- JIA, R; HAN, C; LEI, J. L; LIU, B. L; HUANG, B; HUO, H. H; YIN, S. T. 2015. Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquat. Toxicol.*, 169: 1-9.
- JONES, D. P. 2006. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *RejuvenationResearch*,9: 169-181.
- KODAMA, G; ANNUNCIACÃO, W. F; SANCHES, E. G; GOMES, C.H.A.M; TSUZUKI, M. Y. 2011. Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprionocellaris*, em sistema de recirculação. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 37(1): 61 – 72.
- KUAI, L. VERSTRAETE, W. 1999. Autotrophic denitrification with elemental sulphur in small-scale wastewater treatment facilities. *Environ. Technol. Volume 20: 201–209*. [Doi.org/10.1080/09593332008616809](https://doi.org/10.1080/09593332008616809)
- LEARMONTH, C; CARVALHO, A. P. 2015. Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of zebrafish-Setting nitrate safety levels for zebrafish rearing. *The Fish Haus Zebrafish*,12 (4): 305-311. Epub, 2015. [Doi:10.1089/zeb.2015.1098](https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1098).
- LI, J. J; WANG, X. H; WANG, Y; WEN, Y; QIN, W. C; SU, L. M; ZHAO, Y. H. 2015. Discrimination of excess toxicity from narcotic effect: Influence of species sensitivity and bioconcentration on the classification of modes of action. *Chemosphere*, 120: 660-673. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.013](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.013)

- LI, J. J; TAI, H. W; YU, Y; WEN, Y; WANG, X. H; ZHAO, Y. H. 2015. Comparison of toxicity of class-based organic chemicals to algae and fish based on discrimination of excess toxicity from baseline level. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1): 292-299. Doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.003
- LI, M; GONG, S; LI, Q; YUAN, L; MENG, F; WANG, R. 2016. Ammonia toxicity induces glutamine accumulation, oxidative stress and immunosuppression in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *CompBiochemPhysiol. C Toxicol.Pharmacol.*, 183-184:1-6. Doi: 10.1016/j.cbpc.2016.01.005.
- LOPES, P. A; PINHEIRO, T; SANTOS, M.C; MATHIAS, M. D. L; COLLARES PEREIRA, M.J; VIEGAS-CRESPO, A. M. 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscusalburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci Total Environ.*, 280:153-163.
- LUSHCHAK, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat.Toxicol.*, 101:13-30. Doi: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006.
- LYKKESFELDT, J; SVENDSEN, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173: 502–511. Doi:10.1016/j.tvjl.2006.06.005.
- MALTEZ, L.C; STRINGHETTA, G. R; ENAMORADO, A. D; OKAMOTO, M. H; ROMANO, L. A; MONSERRAT, J. M; SAMPAIO, L. A; GARCIA, L. 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *FishPhysiolBiochem* 1-13. DOI 10.1007/s10695-017-0406-8.
- MARTINS, C. I. M; EDINGA, E. H; VERDEGEMA, M. C. J; HEINSBROEKA, L. T. N; SCHNEIDER, O; BLANCHETOND, J. P; ROQUE D'ORBCASTEL, E; VERRETH, J. A. J. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 43: 83–93.
- MITTON, F. M; Ferreira, J. L. R; GONZALEZ, M; MIGLIORANZA, K. S; MONSERRAT, J. M; 2016. Antioxidant responses in soybean and alfalfa plants grown in DDTs contaminated 103 soils: Useful variables for selecting plants for soil phytoremediation? *Pest. Biochem. Physiol.* 130, 17-21.
- MEDEIROS, R. S; LOPEZ, B. A; SAMPAIO, L. A. 2016. Ammonia and nitrite toxicity to false clownfish *Amphiprionocellaris*. *Aquacult. Int.*, 24: 985. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9965-9>.

- MOELLERING, D; MCANDREW, J; PATEL, R. P; CORNWELL, T; LINCOLN, T; CAO, X; DARLEY-USMAR, V. M; 1998. Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of γ -glutamylcysteine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 358: 74-82.
- MONSEES, H; KLATT, L; KLOAS, W & WUERTZ. S. 2016. Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Research*, 2016, 1–11. Doi:10.1111/are.13174.
- MOUSAVI, S; IBRAHIM, S; AROUA, M.K; GHAFARI, S. 2012. Development of nitrate elimination by autohydrogenotrophic bacteria in bio-electrochemical reactors: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 67: 251–264. Doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.016.
- NGUYEN, V. K; HONG, S; PARK, Y; JO, K; LEE, TAEHO. 2015. Autotrophic denitrification performance and bacterial community at biocathodes of bioelectrochemical systems with either abiotic or biotic anodes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (2): 180-187.
- OAKES, KD; GJ, VAN DER KRAAK. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicol.*, 63: 447-463.
- OLIVOTTO, I; CARDINALI, M; BARBARESI, L; MARADONNA, F; CARNEVALI, O. 2003. Coral reef fish breeding: The secrets of each species. *Aquaculture*, 224: 69 - 78. Doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00207-2.
- OLIVOTTO, I;STEFANO, M;ROSETTI, S; COSSIGNANI, L; PUGNALONI, A; GIANTOMASSI, F;CARNEVALI, O. 2011. Live prey enrichment, with particular emphasis on HUFAs, as limiting factor in false percula clownfish (*Amphiprionocellaris*, Pomacentridae) larval development and metamorphosis: molecular and biochemical implications. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 159: 207–218.
- PIERCE, R. H; WEEKS, J. M; PRAPPAS, J. M. 1993. Nitrate toxicity to five species of marine fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24: 105–107.
- POERSCH, L. H; SANTOS, M. H. S; MIRANDA FILHO, K; WASIELESKY JR, W. 2007. Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugilplatanus* (Pisces: Mugilidae). *Bol. Inst. Pesca*, 33: 247-252.
- REZENDE, FA. 2010. Intensificação da coloração em peixes ornamentais com uso de rações enriquecidas com pigmentos naturais. Tese Doutorado (Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa Minas Gerais. 128p.

- RHYNE, A. L; TLUSTY, M. F. 2012. Trends in the marine aquarium trade: the influence of global economics and technology Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation. International Journal of the Bioflux Society, 5 (2): 99-102.
- RHYNE, A. L; TLUSTY, M. F; SCHOFIELD,P. J; KAUFMAN,L; MORRIS JR, J. A. 2012. Revealing the appetite of the marine aquarium fish trade: the volume and biodiversity of fish imported into the United States. PLoS ONE, 7: e35808.
- RIJN, J. V; TAL, Y; SCHREIER, H. J. 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. Aquacultural Engineering., 34: 364–376.
- SCHRAM, E; ROQUES, J. A; ABBINK, W; SPANINGS, T, DE VRIES P; BIERMAN, S; VAN DE VIS, H; FLIK, G. 2010. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*).Aquaculture, 306:108 -115.
- SEDLAK, J. E LINDSAY, R.H. 1968. Estimates of total groups, bound to proteins and nonprotein sulfhydrylgroups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem., 25: 192-205.
- SINHA, A. K; ABDELGAWAD, H; GIBLEN, T., ZINTA, G; DE ROP, M; ASARD, H; BLUST, R; DE BOECK, G. 2014. Anti-oxidative defences are modulated differentially in three freshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress. PloSOne 9, e95319.
- SIVA, M.U; HAQ, M. A.B. 2017. Embryonic development of anemone fish in captivity. J. Oceanogr. Mar. Sci.,8: 1-13.DOI: 10.5897/JOMS2016.0123.
- STORMER, J; JENSEN, F.B; RANKIN, J.C. 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 1943–1950.
- SUN, H; WANG, W; LI, J; YANG, Z. 2014. 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. Doi: 10.1002/etc.2613.
- THOMAS, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. In: ADAMS, S.M. (Eds.) Biological indicators of stress in fish. Maryland: American Fisheries Society. 1990, p.9-28.
- THORNHILL, D, J. 2012. Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade. Defenders Wildl. Available: <https://www.defenders.org/sites/default/files/publications/ecological-impacts-and-practices-of-the-coral-reef-wildlife-trade.pdf>.

- THURSTON, R. V; RUSSO, R. C; SMITH, C. E. 1978. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. *Trans. Am. fish. Soc.*, 107: 361-368.
- TIMMONS, MB, JM EBELING. 2010. *Recirculating Aquaculture*. 2° Ed. NRAC Publications. 948p.
- TLUSTY, M. 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 205:203-219.
- TOMASSO, J. R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, 2(4): 291-314.
- TSAI, S. J e CHEN, J. C. 2002. Acute toxicity of nitrate on *Penaeus monodon* juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 89: 127-137.
- UNESCO. 1983. *Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12*, Intergovernmental Oceanographic Commission.
- VAN BUSSEL, C. G. J; SCHROEDER J. P, WUERTZ S e SCHULZ, C. 2012. The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 326-329: 163-167.
- VAN DER OOST, R; BEYER, J; VERMEULEN, N. P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 571-49.
- VAN RIJN, J. 1996. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture-A review. *Aquaculture*, 139: 181-201.
- VAN RIJN J; TAL, Y; SCHREIER, H. J. 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering*, 34: 364-376.
- VAN RIJN J. 2013. Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 53, 49–56. Doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.010.
- WABNITZ, C; TAYLOR, M; GREEN, E; RAZAK, T. 2003. *From Ocean to Aquarium*. Cambridge, UK: UNEP-WCMC. 64 p.
- WANG, C; LU,G; CUI, JIN; WANG, P; Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:414-419 Doi.org/10.1016/j.etap.2009.07.005
- WITTENRICH, M. L. 2007. *The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes*. T.F.H Publications. Neptune city. 301p.
- ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, Prentice Hall. 620p.

ANEXO

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propeps.furg.br

CE



CERTIFICADO Nº P073/2017

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos do nitrato em juvenis do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*", protocolo nº 23116.008568/2017-23, sob a responsabilidade de Luis André Nassr de Sampaio - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 13 de dezembro de 2017 (Ata 012/2017).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq029/2017
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Mário Dias Carneiro; Anastácia Amália Damasceno Rodrigues
VIGÊNCIA DO PROJETO	31/07/2018
ESPÉCIE/LINHAGEM / RAÇA	<i>Amphiprion ocellaris</i> (peixe-palhaço)
NUMERO DE ANIMAIS	180
PESO/ IDADE	15 mg / 20 dias
SEXO	Indeterminado
ORIGEM	Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha – LAPEM, EMA, FURG
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Agosto/2018

Rio Grande, 14 de dezembro de 2017.

Med. Vet. Márcio de Azevedo Figueiredo
Coordenador da CEUA-FURG

