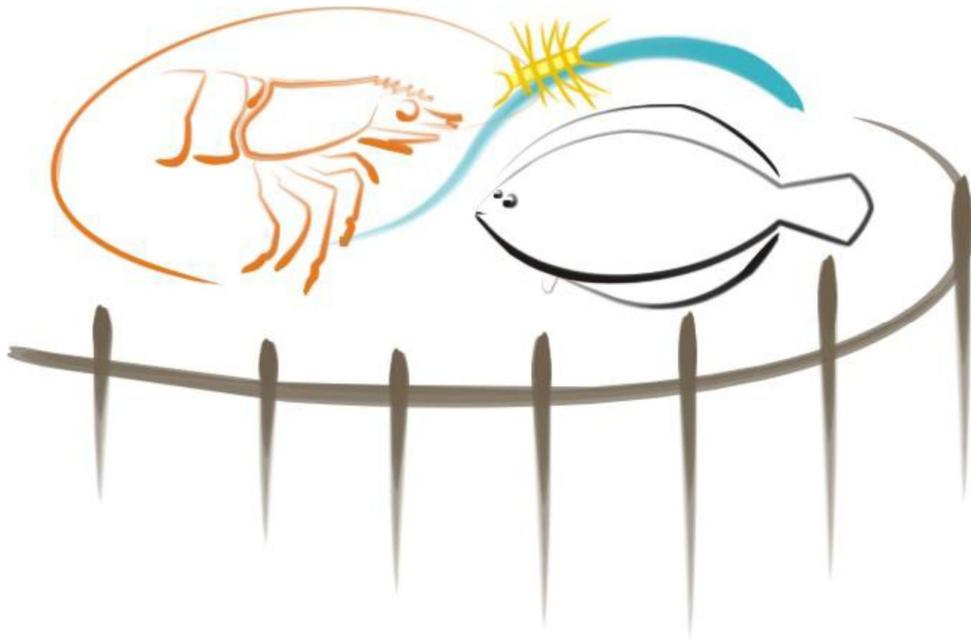


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



Efeito do nitrato sobre os parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo de juvenis de tainha (*Mugil liza*) na água doce

Liliane Soares Presa

**RIO GRANDE, RS
2018**

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

**EFEITO DO NITRATO SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO DE JUVENIS DE TAINHA (*Mugil liza*) NA ÁGUA
DOCE**

LILIANE SOARES PRESA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUCIANO DE OLIVEIRA GARCIA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura pelo Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

**Rio Grande/RS
Julho/2018**

Ficha catalográfica

P928e Presa, Liliane Soares.

Efeito do nitrato sobre os parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo de juvenis de tainha (*Mugil liza*) na água doce / Liliane Soares Presa. – 2018.
55p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2018.

Orientador: Dr. Luciano de Oliveira Garcia.

1. Peixe 2. Parâmetros Bioquímicos 3. TBARS 4. Capacidade Antioxidante 5. Toxicidade Aguda I. Garcia, Luciano de Oliveira II. Título.

CDU 577:639.3

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Índice

Agradecimentos.....	vi
Resumo geral.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
Objetivos.....	8
Referências Bibliográficas.....	9
Capítulo I:.....	15
Conclusões Gerais.....	50

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família!

Agradecimentos

A Deus;

Aos meus pais Dinair Ribeiro e Teodoro Ribeiro, por toda dedicação, formação pessoal amor, carinho e incentivo para seguir em frente, pois sem vocês eu nada seria;

Ao meu amigo e orientador Luciano de Oliveira Garcia, por dividir comigo seu conhecimento e pela orientação nesse trabalho;

Aos meus amigos do LAC: Lilian, Daniel, Lucas, Gabriel e a nosso famoso técnico Lucas Maltez, obrigada pela parceria e amizade;

Aos servidores e amigos do LAC, Dinamarcia, Marquinhos, Aldemar e Fernando, vocês foram demais, obrigada por tudo;

Ao meu namorado Patrick, pela paciência, amor, dedicação e por ter ficado ao meu lado nos momentos mais difíceis;

A minha amiga Roberta, por dividir comigo não só os vinhos nas noites frias, como também os problemas do dia- dia,

Aos professores do programa por terem sido sempre solícitos e por dividirem seus conhecimentos comigo, obrigada;

À FURG e ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura pela oportunidade;

A CAPES pelo apoio financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Resumo Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos subletais da exposição de juvenis de tainha (*Mugil liza*) ao nitrato na água doce. Sendo assim, foi realizada a determinação da concentração letal mediana (CL_{50-96h}) ao nitrato (0; 86; 462; 852 e 968 mg N-NO₃ L⁻¹), sendo a mesma estimada em 606,07 mg N-NO₃ L⁻¹. Após a definição da CL_{50-96h} os peixes (105,2 ± 8,4 g) foram expostos, por 5 dias, a três concentrações subletais de nitrato (8,0 ± 2,0; 34,0 ± 1,0; 52,0 ± 6,0 mg N-NO₃ L⁻¹) e um controle (0,05±0,02 mg N-NO₃ L⁻¹). Neste período foram realizadas coletas de sangue para determinação da glicose, hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, pH sanguíneo e índices hematimétricos (1 e 5 dias) após a exposição dos peixes ao nitrato. Para as análises de estresse oxidativo foram realizadas coletas de brânquias, fígado e músculo (1, 2 e 5 dias), após a exposição às condições experimentais. Foram coletados nove peixes/coleta/tratamento para verificação dos níveis de lipoperoxidação (LPO-TBARS), capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) e a atividade da glutathione S-transferase (GST). As concentrações de glicose no plasma de *M. liza* apresentaram inicialmente uma diminuição (1 dia) e um aumento (5 dias) nas maiores concentrações de nitrato (34 e 52 mg N-NO₃ L⁻¹) em relação ao controle e 8 mg N-NO₃ L⁻¹. Os níveis de eritrócitos diminuíram na maior concentração (52 mg N-NO₃ L⁻¹ – 1 dia) quando comparado aos demais tratamentos. A hemoglobina, após 5 dias de exposição ao nitrato aumentou significativamente em todos os tratamentos quando comparado ao dia 1. Os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) apresentaram alterações nos diferentes tratamentos ao longo do tempo e entre os tratamentos. A exposição ao nitrato aumentou a LPO (1 dia) nas brânquias dos animais expostos a 34 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao controle. A ACAP nas brânquias e fígado dos juvenis de tainha foram maiores nos animais expostos as maiores concentrações de nitrato (34 e 52 mg N-NO₃ L⁻¹), em contraste o músculo apresentou uma menor capacidade antioxidante. A atividade da GST nas brânquias, fígado e músculo de *M. liza*, no nosso estudo, apresentaram uma redução durante o período experimental (5 dias). Desta forma, concluímos que a exposição ao nitrato altera os parâmetros bioquímicos de juvenis de tainha (*Mugil liza*) em água doce, ocasionando alterações na lipoperoxidação, capacidade antioxidante e na atividade da GST nos peixes.

Palavras chaves: peixe, parâmetros bioquímicos, TBARS, capacidade antioxidante, toxicidade aguda.

Abstract

This study had the aim to evaluate the sub-lethal effects of the mullet (*Mugil liza*) juveniles exposure to nitrate in freshwater. Therefore, the median lethal concentration (CL_{50-96h}) to nitrate (0; 86; 462; 852 and 968 mg N-NO₃ L⁻¹) was determined, being estimated in 606.07 mg N-NO₃ L⁻¹. After the definition of the CL_{50-96h} the fish (105.2 ± 8.4 g) were exposed for five days to three nitrate sub-lethal concentrations (8.0 ± 2.0; 34.0 ± 1.0; 52.0 ± 6.0 mg N-NO₃ L⁻¹) and a control (0.05 ± 0.03 mg N-NO₃ L⁻¹). During that period blood samples were taken for the determination of glucose, hematocrit, hemoglobin, erythrocytes counting, blood pH and hematimetric indices (days 1 and 5) after the fish exposure to nitrate. For oxidative stress analyzes, gills, liver and muscle were sampled (days 1, 2 and 5) after exposure to the experimental conditions. To verify the levels of lipoperoxidation (LPO-TBARS), total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) and the activity of glutathione S-transferase (GST), nine fish/sampling/treatment were sampled. The concentrations of plasma glucose of *M. liza* initially showed a decrease (day 1) and an increase (days 5) on the higher nitrate concentrations (34 and 52 mg N-NO₃ L⁻¹) compared to control and to 8 mg N-NO₃ L⁻¹. The levels of erythrocytes decreased in the highest concentration (52 mg N-NO₃ L⁻¹ – 1 day) when compared to other treatments. After five days of nitrate exposure, the hemoglobin increased significantly in all treatments when compared to day 1. The hematimetric indices (MCV, MCH and MCHC) presented alterations in different treatments throughout time and between treatments. The exposure to nitrate increased the LPO (day 1) in gills of fish exposed to 34 mg N-NO₃ L⁻¹ compared to control. The ACAP in gills and liver of mullet juveniles were higher in fish exposed to higher nitrate concentrations (34 and 52 mg N-NO₃ L⁻¹), in contrast the muscle showed a lower antioxidant capacity. The GST activity in gills, liver and muscle of *M. liza*, in our study, presented a reduction during the experimental period (5 days). Thus, we conclude that the exposure to nitrate changes the biochemical parameters of mullet juveniles (*Mugil liza*) in freshwater, causing stress to these fish.

Key words: fish, biochemical parameters, TBARS, antioxidant capacity, toxicity acute.

Introdução

A aquicultura se destaca como o setor da produção animal que mais cresce no mundo (De Carvalho 2013), sendo que no ano de 2014 a produção total do pescado foi de 167,2 milhões de toneladas, das quais 73,8 milhões de toneladas (US\$ 160,2 bilhões) foram produzidas pela aquicultura (FAO, 2016).

Neste cenário, o Brasil encontra-se na 14^a posição no ranking dos países com maior produção aquícola no mundo e é o segundo maior produtor de organismos aquáticos no continente americano após o Chile, com uma produção de 562,5 mil toneladas, o que representa 26,02% da produção entre as três Américas (FAO, 2016).

A piscicultura marinha, por sua vez, apresenta-se em fase inicial de desenvolvimento de técnicas e pesquisas, as quais visam um avanço na produção de espécies promissoras. A tainha (*Mugil liza*), apresenta características e bom potencial para a aquicultura devido ao seu hábito alimentar (detritívoro/iliófagos), alto valor nutritivo, boa qualidade da carne e alta demanda do mercado consumidor (Oliveira & Soares, 1996; Sampaio et al. 2002; Okamoto et al. 2006). Além disso, suporta bem condições de confinamento, aceita com facilidade alimentos artificiais, é eurialina e euritérmica (Oliveira & Soares 1996; Fonseca- Neto & Spach, 1998) e sua produção pode ser realizada em sistemas de mono e policultivo (Benetti & Fagundes Netto, 1991; Fonseca- Neto & Spach, 1998).

Esta espécie se distribui desde o estado do Rio de Janeiro, no Brasil, até a Argentina (Menezes & Figueiredo 1985), apresentando grande importância econômica no Sul do Brasil, principalmente para a pesca artesanal na região do estuário da Lagoa dos Patos (Reis & D' Incao 2000; Okamoto et al. 2006).

O aumento da produção de peixes marinhos passa pelo aprimoramento das técnicas de cultivo empregadas e, dentre elas os sistemas de criação e o local do empreendimento. Atualmente os sistemas intensivos de produção passaram a ter uma maior notoriedade, pois permitem um aumento da produção por área e um menor uso de água para a produção, gerando um menor impacto ambiental (Piedrahita 2003; Zhang et al. 2011).

Neste sentido, o sistema de recirculação de água (SRA), sistema intensivo de produção, apresenta como vantagem a manutenção de adequada qualidade da água para os animais durante todo o cultivo (Martins et al. 2009; Zhang et al. 2011; Van Rijn 2013). Neste sistema, utiliza-se um filtro biológico colonizado por bactérias nitrificantes, sendo elas as que oxidam a amônia (NH_3), excretada pelos peixes e decorrente da decomposição da matéria orgânica, em nitrito (NO_2^-), e subsequentemente em nitrato (NO_3^-) (Timmons et al. 2006).

Apesar dos benefícios gerados pelo SRA, um dos principais limitantes nesse tipo de sistema é o acúmulo de nitrato, em um longo período de criação, os quais podem atingir valores entre 100 e 1000 mg L^{-1} (Van Rijn 1995; Learmonth & Carvalho 2015). Estes valores muitas vezes não causam mortalidades dos animais, contudo podem gerar desconforto, estresse e desencadear uma série de efeitos subletais (Camargo et al. 2005).

A remoção do nitrato do sistema seria possível por meio de filtros desnitrificadores, ou seja, redução do nitrato para o nitrogênio gasoso, sendo este processo conduzido por microorganismos anaeróbios facultativos em processos autotróficos ou heterotróficos, através de diferentes métodos (Van Rijn et al. 2006; Nguyen et al. 2015). As técnicas de remoção podem envolver processos bióticos e abióticos, entre eles, alguns métodos de troca iônica, eletrodialise, adsorção de carvão

ativado, bem como tratamentos microbianos e sistemas aquapônicos (Mousavi et al. 2012; Hundley & Navarro 2013). Embora existam meios para a retirada do nitrato do SRA, as tecnologias ainda são pouco utilizadas devido aos altos custos de investimento inicial e operação (Azevedo et al. 2014).

Alguns trabalhos demonstram que a sensibilidade ao nitrato pode variar muito entre espécies, fases de vida, tempo de exposição e concentrações deste composto no ambiente de cultivo. Além disso, alguns trabalhos demonstram que os peixes de água doce são mais sensíveis ao nitrato do que as espécies marinhas (Camargo et al. 2005; Hamlin et al. 2008; Learmonth & Carvalho 2015), sendo assim, nem todas as espécies irão tolerar igualmente as concentrações de nitrato frequentemente observadas no SRA.

Os parâmetros de qualidade de água, quando em concentrações ou faixas fora daquelas ideais para o bom desenvolvimento de uma espécie, podem afetar o desempenho zootécnico (Schram et al. 2012), a susceptibilidade a doenças (Davidson et al. 2014; Rodrigues et al. 2011), parâmetros bioquímicos sanguíneos e provocar estresse nos animais (Pickering & Pottinger 1995; Hamlin et al. 2008). Um desses fatores podem ser as concentrações de nitrato presentes no SRA que podem gerar alterações bioquímicas e fisiológicas nos animais, mesmo em concentrações baixas, dentre elas o estresse.

Barton (2002) divide o estresse em três etapas: primária (liberação de cortisol e catecolaminas no sangue), secundária (efeito hormonal sobre sangue e tecidos, distúrbios hidromineral e metabólico) e terciária (inibição do crescimento, desenvolvimento, reprodução e imunossupressão). Portanto, alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos são uma das primeiras respostas observadas nos peixes expostos a situações de estresse (Heath, 1995).

Sendo assim, os parâmetros sanguíneos podem ser considerados biomarcadores na avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes, ou condições ambientais desfavoráveis e podem apresentar alterações quando os animais são submetidos a um agente estressor, fornecendo informações relevantes sobre as condições fisiológicas e a saúde do indivíduo ou de sua população (Tavares-dias & Moraes 2007). As análises sanguíneas são uma importante ferramenta para a aquicultura (Satheeshkumar et al. 2012), pois permitem a detecção precoce de agentes estressores evitando efeitos deletérios mais graves.

Para evitar que danos mais severos ocorram, o organismo aeróbico, apresenta um sistema de defesa que inclui as defesas antioxidantes. O sistema de defesa antioxidante, consiste principalmente de enzimas antioxidantes, como a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), enzimas dependentes da glutatona, como a Glutaciona peroxidase (GPx), Glutaciona redutase (GR) e a Glutaciona S-transferase (GST) e defesas não enzimáticas como aminoácidos, tocoferol, vitaminas E, K e C, Glutaciona reduzida (GSH), ácido lipóico, flavonóides e o ácido ascórbico (Martínez-Álvarez et al. 2005; Bagnyukova et al. 2007; Grim et al. 2010).

Este sistema de defesa, onde os fatores pró-oxidantes (endógenos ou exógenos) e as defesas antioxidantes (enzimática e não enzimática) nos sistemas biológicos devem permanecer em equilíbrio. O desequilíbrio na produção de pró-oxidantes em relação aos antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, desencadeiam o estresse oxidativo, o qual pode ser usado para avaliar os efeitos tóxicos de diferentes substâncias em condições ambientais estressantes. Estas condições podem ser ocasionadas por diferentes poluentes (Valavanidis et al. 2006), que, direta ou indiretamente, promovam a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou alteração das defesas antioxidantes

(Valavanidis et al. 2006; Monserrat et al. 2007). Estas respostas podem estar relacionadas com a localização, rota de exposição e distribuição dos poluentes, bem como a capacidade de defesa do organismo (Ahmad et al. 2006).

Nos últimos anos, estudos mostraram que a exposição de peixes a compostos nitrogenados pode induzir estresse oxidativo, devido ao aumento na produção de ERO e/ou redução nas defesas antioxidantes (Ching et al. 2009; Hegazi et al. 2010; Yang et al. 2010; Sinha et al. 2014; Sun et al. 2014; Cheng et al. 2015; Maltez et al. 2018).

Entretanto, na literatura ainda não há estudos que avaliem os efeitos no sistema de defesa antioxidante e níveis de dano oxidativo na tainha (*Mugil liza*) expostos ao nitrato, na água doce. Sendo assim, as respostas obtidas neste estudo poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos de toxicidade do nitrato, como também estabelecimento de critérios de qualidade de água e manejo adequado nos sistemas de produção, assegurando bem estar aos animais.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos subletais da exposição aguda ao nitrato, em juvenis de tainha (*Mugil liza*), na água doce, através da verificação dos parâmetros sanguíneos, de estresse oxidativo e lipoperoxidação como biomarcadores.

Objetivos Específicos

- Determinar a concentração letal mediana (CL_{50-96 h}) causada pela toxicidade aguda do nitrato em juvenis da tainha (*Mugil liza*), na água doce;
- Verificar os efeitos de diferentes níveis de nitrato nos parâmetros hematológicos (glicose, hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, pH sanguíneo e índices hematimétricos de juvenis de tainha, na água doce;
- Avaliar os efeitos da exposição aguda, de diferentes concentrações de nitrato, no sistema de defesa antioxidante e dano lipídico no fígado, músculo e brânquias de juvenis de tainha, na água doce.

Referências Bibliográficas

AHMAD I, PACHECO M AND SANTOS MA. 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65: 952–962.

AZEVEDO VG, GALLO NETO H, ALMEIDA HLP. S AND SANCHES EG. 2014. Sistemas de Recirculação para Cultivo de Peixes Marinhos- Procedimento Operacional Padrão (POP). Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte- Boletim do Instituto de Pesca.

BAGNYUKOVA TV, LUSHCHAK OV, STOREY KB AND LUSHCHAK VI. 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by *goldfish* tissues to acute change of temperature from to 23 C. *J Therm Biol* 32: 227–234.

BARTON BA. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr Comp Biol* 4: 517–525.

BENETTI DD AND FAGUNDES NETO EB. 1991. Preliminary results on growth of *mulletts* *Mugil liza* and *Mugil curema* fed artificial diets. *Word Aquacult* 22: 55-57.

CAMARGO JA, ALONSO A AND SALAMANCA A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58: 1255–1267.

CHENG CH, YANG FF, LING RZ, LIAO SA, MIAO YT, YE CX AND WANG AL. 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquat Toxicol* 164: 61– 71.

CHING B, CHEW SF, WONG WP AND IP YK. 2009. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (*mudskipper*). *Aquat Toxicol* 95: 203–212.

DAVIDSON J, GOOD C, WELSH C AND SUMMERFELT ST. 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.

DE-CARVALHO HRL, SOUZA RAL AND CINTRA IHA. 2013. A aquicultura na microrregião do Guamá, Estado do Pará, Amazônia Oriental, Brasil. *Rev Cienc Agrar* 56: 1-6.

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.

FONSECA NETO, JC AND SPACH HL. 1998. Effect of environmental salinity on the apical surface of chloride cells of the euryhaline teleost *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae). *Iheringia Sér Zool* 8: 151-156.

GRIM JM, MILES DRB AND CROCKETT EL. 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J Exp Biol* 213: 445–452

HALLIWELL B AND GUTTERIDGE JM. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.

HAMLIN HL, MOORE BC, EDWARDS TM, LARKIN ILV, BOGGS A, HIGH WJ, MAIN KL AND GUILLETTE LJ. 2008. Nitrate-induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) in commercial aquaculture. *Aquacultur* 281: 118–125.

HEATH A.G. 1995. Water pollution and fish physiology. Florida: Lewis Publishers. 359p.

HEGAZI MM, ATTIA ZI AND ASHOUR OA. 2010. Oxidative stress and antioxidante enzymes in liver and White muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquat Toxicol* 99: 118–125.

HUNDLEY GC AND NAVARRO RD. 2013. Aquaponia: a integração entre piscicultura e hidroponia. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)* 3: 52-61.

LEARMONTH C AND CARVALHO AP. 2015. Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of zebrafish—Setting nitrate safety levels for zebrafish rearing. *Zebrafish* 2: 305–311.

MALTEZ LC, STRINGHETTA GR, ENAMORADO AD, OKAMOTO MH, ROMANO LA, MONSERRAT JM, SAMPAIO LA AND GARCIA L. 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiol Biochem* 43: 1747-1759.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ RM, MORALES AE AND SANZ A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol* 15: 75-88.

MARTINS CIM, PISTRIN MG, ENDE SSW, EDING EH AND VERRETH JAJ. 2009. The accumulation of substances in recirculating aquaculture systems (RAS) affects embryonic na larval development in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquacult* 291: 65-73.

MENEZES NA AND FIGUEIREDO JL. 1985. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil.V. Teleostei (4). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 105p.

MONSERRAT JM, MARTÍNEZ PE, GERACITANO LA, AMADO LL, MARTINS CM, PINHO GL, CHAVES IS, FERREIRA-CRAVO M, VENTURA-LIMA J AND

BIANCHINI A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp Biochem Phys C Toxicol Pharmacol* 146: 221–234.

MOUSAVI S, IBRAHIM, S, AROUA, MK AND GHAFARI, S. 2012. Development of nitrate elimination by auto hydrogeno trophic bacteria in bio-electrochemical reactors: A review. *Biochem Eng J* 67: 251–264.

NGUYEN VK, HONG S, PARK Y, JO K AND LEE T. 2015. Autotrophic denitrification performance and bacterial community at bio cathodes of bio electro chemical systems with either abiotic or biotic anodes. *J Biosci Bioeng* 119: 180-187.

OKAMOTO MH, SAMPAIO LA AND MAÇADA AP. 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha (*Mugil platanus* Günther, 1980). *Atlântica* 28: 61-66.

OLIVEIRA IR AND SOARES LSH. 1996. Alimentação da tainha (*Mugil platanus* Günther, 1880) (Pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 23: 95-104.

PIEDRAHITA RH. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquacult* 226: 35–44.

PICKERING AD AND POTTINGER TG. 1995. Biochemical effects of stress. In: Hochachka, PW; Mommsen, TP. (eds.) *Environmental and Ecological Biochemistry* Amsterdam Elsevier. 349-379.

REIS EG AND D'INCAO F. 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort to wards community-based management. *Oc Coast Manage* 43: 585-595.

RIJN JV, TAL Y AND SCHREIER HJ. 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacul Eng* 34: 364–376.

RODRIGUES RV, SCHWARZ MH, DELBOS BC, CARVALHO EL, ROMANO LA AND SAMPAIO LA. 2011. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. *Aquacult* 322–323: 223–226.

SAMPAIO LA, WASIELESKY W AND MIRANDA FILHO KC. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus* . *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology* 68: 668-674.

SATHEESHKUMAR P, ANANTHAN G, SENTHILKUMAR D, KHAN AB AND JEEVANANTHAM K. 2012. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. *Comp Clin Path* 21: 275-281

SCHRAM E, ROQUES JAC, ABBINK W, YOKOHAMA Y, SPANINGS T, VRIES P, BIERMAN S, VIS HV AND FLIK G. 2012. The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquacult Res* 45: 1499-1511.

SINHA AK, ABDELGAWAD H, GIBLEN T, ZINTA G, DE ROP M, ASARD H, BLUST R AND DE BOECK G. 2014. Anti-oxidative defences are modulated differentially in three freshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress. *PLoS One*. 9: e95319.

SUN H, WANG W, LI J AND 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.

TAVARES-DIAS M AND MORAES FR. 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *J Fish Biol* 71: 383-388.

TIMMONS N, TIMMONS MB AND EBELING JM. 2006. Recirculating Aquaculture System (RAS) technologies — Part 2. *Aquacult Mag* 32–39 (September/October 2006).

VALAVANIDIS A, VLAHOGIANNI T, DASSENAKIS M AND SCOULLOS M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Safe* 64: 178-189.

VAN RIJN J. 1995. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture--a review. *Aquacult* 139: 181–201.

VAN RIJN J. 2013. Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacult Eng* 53: 49–56.

YANG W, XIANG F, LIANG L AND YANG Z. 2010. Toxicity of ammonia and its effects on oxidative stress mechanisms of juvenile crucian carp (*Carassius auratus*). *J Fresh W Eco* 125: 297–302.

ZHANG SY, LI G, WU HB, LIU XG, YAO YH, TAO L AND LIU H. 2011. An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: the effects on water quality and fish production. *Aquacul Eng* 45: 93–102.

Capítulo I

Manuscrito

**EFEITO DO NITRATO SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO DE JUVENIS DE TAINHA (*Mugil liza*) NA ÁGUA
DOCE**

**EFEITO DO NITRATO SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO DE JUVENIS DE TAINHA (*Mugil liza*) NA ÁGUA
DOCE**

Liliane S Presa¹, Lucas C Maltez¹, Gabriel C Neves¹, Lilian F Nitz¹, Lucas Pellegrin¹,
Daniel S B Pinto¹, Luís A Sampaio², José M Monserrat³, Luciano Garcia^{1*}.

¹Instituto de Oceanografia, Laboratório de Aquacultura Continental, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

²Instituto de Oceanografia, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

³Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, RS Brasil.

*Autor correspondente: Luciano Garcia - Laboratório de Aquacultura Continental, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil. E-mail: garcia_log@hotmail.com

Abstract

This study had the aim to evaluate the sub-lethal effects of the mullet (*Mugil liza*) juveniles exposure to nitrate in freshwater. Therefore, the median lethal concentration (CL_{50-96h}) to nitrate (0; 86; 462; 852 and 968 mg N-NO₃ L⁻¹) was determined, being estimated in 606.07 mg N-NO₃ L⁻¹. After the definition of the CL_{50-96h} the fish (105.2 ± 8.4 g) were exposed for five days to three nitrate sub-lethal concentrations (8.0 ± 2.0; 34.0 ± 1.0; 52.0 ± 6.0 mg N-NO₃ L⁻¹) and a control (0.05 ± 0.03 mg N-NO₃ L⁻¹). To perform blood biochemical parameters (days 1 and 5) and oxidative stress analyzes (days 1, 2 and 5) 9 fish/sampling/treatment were sampled after the exposure to the experimental conditions. The concentrations of plasma glucose of the animals initially showed a decrease (day 1) and an increase (day 5) in the higher nitrate concentrations (34 and 52 mg N-NO₃ L⁻¹) compared to control and 8 mg N-NO₃ L⁻¹. The levels of erythrocytes decreased in the highest concentration (52 mg N-NO₃ L⁻¹ – day 1) when compared to other treatments. After five days of exposure, the hemoglobin increased significantly in all treatments in relation to day 1. The indices of MCV, MCH and MCHC presented alterations in different treatments throughout time and between treatments. The exposure to nitrate increased the LPO (day 1) in gills of fish exposed to (34 mg N-NO₃ L⁻¹) compared to control. The ACAP in gills and liver of mullet juveniles were higher in fish exposed to higher concentrations of nitrate (34 and 52 mg N-NO₃ L⁻¹), in contrast the muscle showed a lower antioxidant capacity. The GST activity in gills, liver and muscle of *M. liza*, presented a reduction during the experimental period (5 days). The period of five days of exposure to nitrate was enough to affect the biochemical parameters of the mullet. Therefore, we conclude that the exposure to nitrate changes the biochemical parameters of mullet juveniles (*Mugil liza*) in freshwater, causing stress to these animals.

Key words: fish, biochemical parameters, TBARS, antioxidant capacity, toxicity acute.

Introdução

A tainha (*Mugil liza*) se distribui desde o estado do Rio de Janeiro no Brasil até a Argentina (Menezes & Figueiredo 1985). Esta espécie apresenta grande importância no Sul do Brasil, sendo um dos principais recursos pesqueiros da região do estuário da Lagoa dos Patos (Reis & D' Incao 2000; Okamoto et al. 2006). Além de ser um importante recurso pesqueiro, apresenta potencial para a aquicultura devido ao alto valor nutritivo, boa qualidade da carne e alta demanda do mercado consumidor (Sampaio et al. 2002; Okamoto et al. 2006).

A aquicultura encontra-se em um estágio de intensificação da produção, a qual visa o aumento da produtividade em um pequeno espaço, além de minimizar o uso de água, gerando um menor impacto ambiental (Piedrahita 2003; Zhang et al. 2011).

Neste sentido, os sistemas intensivos tem ganhado espaço, tendo o sistema de recirculação de água (SRA) apresentado vantagens; sendo uma delas a manutenção da qualidade da água para os animais durante todo o cultivo (Martins et al. 2010; Zhang et al. 2011; Van Rijn 2013). Apesar dos benefícios gerados pelo SRA, um dos principais limitantes nesse tipo de sistema é o acúmulo de nitrato, os quais podem atingir valores entre 100 e 1000 mg L⁻¹ (Van Rijn 1995; Learmonth & Carvalho 2015).

A toxicidade do nitrato durante vários anos foi subestimada, e a preocupação foi principalmente associada com o potencial do nitrato em estimular a eutrofização (Camargo et al. 2005; Van Bussel et al. 2012). No entanto, estudos demonstraram que diferentes concentrações de nitrato podem levar a toxicidade de diferentes organismos aquáticos (Camargo et al. 2005).

Os efeitos da exposição ao nitrato podem variar, dependendo do período de exposição e das concentrações desse composto no ambiente de cultivo (Camargo et al. 2005). Alguns estudos demonstram que o mecanismo primário de toxicidade do nitrato é a oxidação da hemoglobina formando a metahemoglobina, sendo esta última incapaz de transportar oxigênio, podendo levar os animais a uma anemia funcional e hipóxia tecidual (Guillette & Edwards 2005; Baldiserotto 2013). Além disso, níveis subletais de nitrato podem causar alterações comportamentais (Hamlin et al. 2008), histológicas (Rodrigues et al. 2011), estresse e reduzir o crescimento e a sobrevivência em peixes (Schram et al. 2012; Davidson et al. 2014; Luo et al. 2016).

Os parâmetros sanguíneos podem ser considerados biomarcadores na avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes ou condições ambientais desfavoráveis, e podem apresentar alterações quando os animais são submetidos a um agente estressor, fornecendo informações relevantes sobre as condições fisiológicas e a saúde do indivíduo ou de sua população (Tavares-dias & Moraes 2007; Fernandes et al. 2008). Sendo assim, análises sanguíneas são uma importante ferramenta para a aquicultura (Satheeshkumar et al. 2012), pois permitem a detecção precoce de agentes estressores evitando efeitos deletérios mais graves e/ou de longo prazo. Schram et al. (2012) e Davidson et al. (2014) verificaram que níveis acima de 140 e 100 mg NO₃-N L⁻¹ reduziram a ingestão de alimentos e o crescimento do catfish (*Clarias gariepinus*) e para trutas (*Oncorhynchus mykiss*) diminuição na sobrevivência e redução da biomassa, respectivamente. Em outro trabalho, Sachar & Raina (2014) trabalhando com *Aspidoparia Morar* expostos a três concentrações subletais de nitrato (0,5; 1 e 1,5 mg NO₃-N L⁻¹), por 63 dias, verificaram que os peixes apresentaram hiperglicemia em todos os tratamentos.

Os efeitos subletais do nitrato também podem ocasionar um desequilíbrio na homeostase entre a produção de pró-oxidantes e as defesas antioxidantes de um organismo, causando um cenário de estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge 2015). Este desequilíbrio pode desencadear danos nos lipídios, proteínas, constituintes celulares como DNA e RNA, e alterações nas enzimas antioxidantes (Valavanidis et al. 2006; Halliwell & Gutteridge 2015).

As defesas antioxidantes atuam de forma a minimizar ou controlar os danos ocasionados pelos pró-oxidantes. De acordo com isso, a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST) (enzimáticas); aminoácidos, tocoferol, vitaminas E, K e C, Glutathione reduzida (GSH), ácido lipóico, flavonóides e o ácido ascórbico (não enzimáticas), atuam de forma a eliminar as espécies reativas de oxigênio (ERO) (Belló et al. 2000; Martínez-Álvarez et al. 2005; Grim et al. 2010). Lin et al. (2018) trabalhando com carpa cabeça grande (*Aristichthys nobilis*) expostas ao nitrito ($48,6 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$) por 96 h, onde ficou evidenciado um aumento na atividade das enzimas GPx, GST e GR, demonstrando que o sistema glutathione desempenha um papel importante no estresse oxidativo induzido pelo nitrito.

Portanto, o objetivo de nosso estudo foi avaliar os efeitos da toxicidade aguda do nitrato na tainha (*Mugil liza*), na água doce. Sendo assim, este trabalho visa contribuir para a compreensão dos mecanismos de toxicidade do nitrato, como também estabelecimento de níveis seguros desta substância, assegurando o bem estar dos animais.

Materiais e Métodos

Animais e Condições Experimentais

O protocolo experimental para o desenvolvimento deste estudo foi aprovado pela comissão de ética em uso animal – CEUA/FURG – sob registro de aprovação de nº P019/2018. Foram utilizados juvenis de tainha ($105,2 \pm 8,4$ g), distribuídos aleatoriamente em 12 tanques com volume útil de 250 L, em quatro sistemas de recirculação. Antes do desenvolvimento do protocolo experimental, os juvenis foram acondicionados em grupos de 19 animais/tanque, com aeração individual para um período de aclimatação as condições do laboratório, durante 20 dias. Durante o período de aclimatação os animais foram alimentados com ração comercial (32% de proteína bruta), até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (9:00 e 16:00).

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente, sendo a temperatura e oxigênio dissolvido medidos com oxímetro digital (YSI DO200), a salinidade com refratômetro (Global trade-GT-RUPS), o pH com pHmetro portátil (HANNA HI 8424) e nitrato (Baumgarten et al. 2010). As análises de amônia total (NAT) (UNESCO, 1983), nitrito (Bendschneider & Robinson 1952) e alcalinidade (Eaton et al. 2005) foram verificadas no início e final dos experimentos.

Após o período de aclimatação, uma CL_{50-96h} foi realizada, onde 15 animais foram expostos por tratamento (três repetições por tratamento), a 4 concentrações de nitrato (86, 462, 852, 968 mg $NO_3-N L^{-1}$) e a um controle (0,01 mg $NO_3-N L^{-1}$) em tanques de 100 L. As concentrações letais medianas (CL_{50-96h}) e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram calculados após 96 h, utilizando o software Trimmed Método de Spearman Karber (Hamilton et al. 1977). Para a determinação do

nível de segurança, “*Safe level*”, o valor da CL_{50-96h} foi multiplicado por 0,1, conforme descrito por Sprague (1971).

Após a realização da CL_{50-96h} , os animais foram submetidos, durante 5 dias, a três concentrações subletais de nitrato ($8,0 \pm 2,0$; $34,0 \pm 1,0$; $52,0 \pm 6,0$ mg NO_3-N L^{-1}) e a um tratamento controle ($0,05 \pm 0,02$ mg NO_3-N L^{-1}), cada tratamento com três repetições, 12 peixes/tanque. As concentrações de nitrato, para a CL_{50-96h} e o período experimental, mantiveram-se dentro dos níveis estabelecidos para o experimento com a adição de nitrato de sódio ($NaNO_3$) dissolvido na água.

Coletas

Os peixes foram retirados dos tanques (com auxílio de um puçá) e anestesiados com hidrocloreto de benzocaína (50 mg L^{-1}) e após serem anestesiados foi realizada a coleta de sangue (1 e 5 dias), via veia caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas (1 mL). Imediatamente após a coleta do sangue os mesmos foram eutanasiados (hidrocloreto de benzocaína - 500 mg L^{-1}), para a realização das demais coletas de brânquias, fígado e músculo (1, 2 e 5 dias). Estes tecidos foram armazenados em microtubos de 2 mL, congelados em nitrogênio líquido no momento da coleta e depois armazenados em um ultrafreezer (-80 °C).

Análise Sanguínea

Foram coletados aproximadamente 0,5 mL de sangue de cada peixe para as seguintes análises: glicose (glicosímetro Accu-Chek Performa/Roche[®]), pH sanguíneo (pHmetro de bancada HANNA HI2210), contagem de eritrócitos (Ert) (Natt & Herrick 1952), hemoglobina (Hb) (kit comercial Doles[®]), hematócrito (Ht) (Goldenfarb et al.

1971) e os índices hematimétricos - volume corpuscular médio (VCM: $(Ht/n^{\circ} \text{ Ert}) \times 10$), hemoglobina corpuscular média (HCM: $(Hb/n^{\circ} \text{ Ert}) \times 10$) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM: $(Hb/Ht) \times 100$) (Coles 1986).

Homogeneização dos tecidos

Após coletar as brânquias, fígado e músculo, estes tecidos foram mantidos em um ultrafreezer (-80 °C) e depois homogeneizados (1:5; w/v) em tampão de GCL (Tris-HCl-100 mM; EDTA - 2 mM e $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ - 5 mM), (da Rocha et al. 2009). Os sobrenadantes resultantes da centrifugação dos homogenados (10.000 x g, 20 minutos, 4 °C) foram utilizados para todas as análises. O teor total de proteínas das amostras homogeneizadas foi determinado em um leitor de microplacas (BioTek LX 800) usando um kit comercial (Doles[®]) baseado no ensaio Biureto (550 nm).

Peroxidação Lipídica (LPO)

Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos de acordo com a metodologia descrita por Oakes & Van Der Kraak (2003). Para determinar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pelo MDA (malondialdeído), 20 µL da solução de BHT (67 µM), 150 µL de solução de ácido acético a 20%, 150 µL de solução de TBA a 0,8%, 50 µL de água de Milli-Q, e 20 µL de SDS a 8,1% foram adicionados às amostras (brânquias e fígado: 40µL; músculo: 100 µL), antes de serem aquecidos a 95 °C em banho maria, durante 30 minutos. Posteriormente, 100 µL de água de Milli-Q e 500 µL de n-butanol foram adicionados à solução final. O sobrenadante remanescente após a centrifugação (3.000 x g, 10 minutos, 15 °C) foi usado para determinar a fluorescência (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm) e os resultados foram expressos como nmol TMP

mg tecido proteína⁻¹. TMP representa tetrametoxipropano o qual foi utilizado como padrão.

Atividade da Glutathione-S-Transferase (GST)

A atividade da Glutathione-S-transferase (GST) foi determinada com a utilização de 1 mM de glutathione (GSH) e 1 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) de acordo com a metodologia de Habig et al. (1974) e Habig & Jakoby (1981). A absorbância (340 nm) foi lida em microplacas transparentes de 96 poços utilizando um espectrofotômetro (Victor 2, Perkin Elmer). Os dados foram expressos como nmol do conjugado de CNDB-GSH mg de proteína⁻¹ min⁻¹.

Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) foi determinada pela detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO), nas amostras com ou sem um gerador de radicais peroxil, de acordo com Amado et al. (2009). Todas as amostras foram diluídas com tampão de homogeneização para ficarem padronizadas em 2,0 mg de proteína mL⁻¹. Logo após, foram expostas a radicais peroxil gerados por termodecomposição (37 °C) do dicloridrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) (ABAP, 4 mM). Radicais peroxil reagem com o substrato fluorescente (2',7' diacetato de diclorofluoresceína - H₂DCF-DA) e então foi realizada a fluorimetria (excitação: 485 nm; emissão: 520 nm), a qual foi mensurada em um espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) com leituras a cada 5 minutos, durante 30 minutos. Os resultados foram expressos em área relativa (diferença entre as áreas com e sem ABAP dividida pela área

sem ABAP). Para interpretação dos resultados, uma área relativa maior significa menor capacidade antioxidante.

Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram previamente testadas com Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. Como os pressupostos foram atendidos foi realizado o teste ANOVA de duas vias e uma via utilizando o programa Statistica 7.0, e posteriormente aplicado o teste de Tukey para verificar as diferenças entre os tratamentos, para as análises sanguíneas e de estresse oxidativo, respectivamente. O nível de significância de foi estabelecido em 95% ($p < 0,05$).

Resultados

CL_{50-96h}

As concentrações letais médias de nitrato em juvenis de tainha foram estimadas após 96 h de exposição, com CL_{50-96h} estimada em 606,07 mg NO₃-N L⁻¹ (Intervalo de confiança - 459,19 a 799,93 mg NO₃-N L⁻¹).

Qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água, com exceção do nitrato, se mantiveram dentro dos níveis considerados adequados para a espécie. Durante a aclimação, a CL_{50-96h} e o período experimental, estes parâmetros se mantiveram nas seguintes condições: temperatura ($22,38 \pm 0,05$ °C), pH ($7,38 \pm 0,03$), oxigênio dissolvido ($6,67 \pm$

0,51 mg L⁻¹), alcalinidade (62,3 ± 0,24 mg CaCO₃ L⁻¹), amônia (0,90 ± 0,13 mg NO₄-N L⁻¹) e nitrito (0,39 ± 0,43 mg NO₂-N L⁻¹). As concentrações de NaNO₃ durante o experimento mantiveram-se dentro dos níveis estabelecidos: controle (0,05 ± 0,02 mg NO₃-N L⁻¹); 8,0 ± 2,0; 34,0 ± 1,0; 52,0 ± 6,0 mg NO₃-N L⁻¹. Na CL_{50-96h} as concentrações adicionadas de NaNO₃ resultaram em um aumento gradual da salinidade ficando em cada tratamento os seguintes valores: 2 (86 mg NO₃-N L⁻¹); 4 (462 mg NO₃-N L⁻¹); 6 (852 mg NO₃-N L⁻¹); 8 (968 mg NO₃-N L⁻¹), porém os mesmo não influenciaram os resultados de mortalidade avaliados na CL_{50-96h}.

Parâmetros Sanguíneos

Os níveis plasmáticos de glicose (mg dL⁻¹) foram maiores e menores significativamente nos peixes do tratamento controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹ e 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹, respectivamente, no dia 1 quando comparados ao mesmo tratamento no dia 5. No dia 1 o tratamento de 52 mg NO₃-N L⁻¹ foi significativamente menor quando comparado ao tratamento controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹. Os tratamentos de 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹ foram significativamente maiores quando comparados aos demais tratamentos no dia 5 (Tabela 1).

Juvenis de tainha expostos a 52 mg NO₃-N L⁻¹ apresentaram porcentagem de eritrócitos, no dia 1, significativamente menor quando comparados ao mesmo tratamento no dia 5. No dia 1, os eritrócitos apresentaram diferença significativamente menor no tratamento de 52 mg NO₃-N L⁻¹ quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 1).

A hemoglobina no sangue dos animais, no dia 1, apresentou diferença significativamente menor nos tratamentos de 8, 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹, quando

comparados aos mesmos tratamentos no dia 5. No dia 1, a hemoglobina, apresentou uma diminuição significativa no tratamento de 52 mg NO₃-N L⁻¹ quando comparada aos demais tratamentos. Os valores de hemoglobina apresentaram o seguinte comportamento, onde, todos os tratamentos diferiram entre si no dia 5: 80 > 10 > 40 > controle (Tabela 1).

Índices Hematimétricos

Volume Corpuscular Médio (VCM)

O VCM, no dia 1, apresentou uma diminuição significativa nos animais expostos ao tratamento controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹, quando comparados aos mesmos tratamentos no dia 5. Os valores de VCM, no dia 5, apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, onde o tratamento 8 > C > 34 > 52 mg NO₃-N L⁻¹.

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

A HCM, no dia 1, apresentou diferença significativamente menor nos peixes expostos ao tratamento de 8, 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹ quando comparado aos mesmos tratamentos no dia 5. No dia 1 e 5, o tratamento de 8 mg NO₃-N L⁻¹ e o controle apresentaram diferença significativa maior e menor, respectivamente, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 1).

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

No dia 1, os animais expostos ao tratamento de 52 mg NO₃-N L⁻¹ apresentaram diferença significativa menor quando comparada ao mesmo tratamento no dia 5. O CHCM, no dia 1, foi significativamente maior no tratamento de 8 mg NO₃-N L⁻¹ quando

comparado aos demais tratamentos no mesmo período. Os animais expostos a 8 e 52 mg NO₃-N L⁻¹ apresentaram um aumento significativo, no dia 5, quando comparados ao controle e 34 mg NO₃-N L⁻¹ (Tabela 1).

Parâmetros Bioquímicos

Peroxidação Lipídica (LPO)

A LPO nas brânquias, nos dias 1 e 2, apresentaram um aumento significativo nos animais expostos a concentração de 34 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao tratamento controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹, respectivamente (Fig. 1A).

Os peixes expostos a 52 mg NO₃-N L⁻¹ apresentaram diferença significativa menor nos níveis de LPO no fígado, no dia 2, em relação aos demais tratamentos (Fig. 1B).

Os níveis de LPO no músculo dos juvenis não apresentaram diferença significativa nos 5 dias experimentais (Fig. 1C).

Capacidade antioxidante Total (ACAP)

A ACAP nas brânquias foi maior nos peixes expostos as concentrações de 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹, quando comparado ao tratamento controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹, no dia 1 e 5. Além disso, há uma diferença significativa maior do tratamento de 8 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao controle, no dia 5. No dia 2 houve um aumento na ACAP dos animais nas concentrações de 8, 34 e 52 NO₃-N L⁻¹ em relação ao tratamento controle (Fig. 2A).

A ACAP no fígado dos animais expostos as concentrações de 8, 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹, apresentaram diferença significativa maior, no dia 1, em relação ao

tratamento controle. No dia 5, a ACAP no fígado diferiu significativamente nos animais expostos a 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹ (Fig. 2B).

No músculo, a ACAP, apresentou diferença significativamente menor nos animais expostos a 52 mg NO₃-N L⁻¹ quando comparado aos demais tratamentos no dia 1 e 2, porém no dia 2 não há diferença com o controle (Fig. 2c).

Glutathione-S-transferase (GST)

A GST nas brânquias dos peixes, no dia 1, apresentou maior atividade no tratamento de 52 mg NO₃-N L⁻¹ quando comparada ao controle e de 8 mg NO₃-N L⁻¹, também havendo diferença significativa maior neste período, do tratamento de 8 e 34 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao controle. No dia 2, a atividade da GST nas brânquias, foi significativamente menor no tratamento de 52 mg NO₃-N L⁻¹ quando comparado aos demais tratamentos. Os peixes no dia 5, apresentaram menor atividade da GST, nas concentrações de 8 e 34 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao controle; e o tratamento de 52 mg NO₃-N L⁻¹ apresentou menor atividade em relação aos demais tratamentos (Fig. 3A).

A atividade da GST no fígado dos animais expostos a 34 mg NO₃-N L⁻¹, no dia 1, apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹. No dia 2, houve uma menor atividade da GST no fígado, nos animais expostos a 8, 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹ quando comparados ao controle. No dia 5, houve uma diminuição significativa na atividade da GST, nos peixes expostos a 8 e 52 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao controle e 34 mg NO₃-N L⁻¹, havendo também diferença significativa entre os tratamentos controle e 34 mg NO₃-N L⁻¹ (Fig. 3B).

A atividade da GST no músculo dos juvenis de tainha, no dia 1 e 5, apresentaram menor atividade nos animais expostos a 8, 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹ em

relação ao controle, também havendo diferença significativa entre os tratamentos de 8 e 34 mg NO₃-N L⁻¹ em relação a 52 mg NO₃-N L⁻¹. No dia 2, a atividade da GST diminuiu significativamente nos animais expostos a 52 mg NO₃-N L⁻¹ em relação aos demais tratamentos (Fig. 3C).

Discussão

CL_{50-96h}

No presente estudo a CL_{50-96h} de nitrato foi estimada em 606,07 mg NO₃-N L⁻¹ para juvenis de tainha na água doce. Poersch et al. (2007) trabalhando com a mesma espécie, porém em água salgada, obtiveram uma CL_{50-96h} de 1522 mg NO₃-N L⁻¹, entretanto, essa maior toxicidade no presente estudo pode ser explicada pelo fato do nitrato ser mais tóxico em ambientes de água doce (Camargo et al. 2005; Kuhn et al. 2010). Este fato já foi observado em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, *Poecilia reticulatus* e *Ictalurus punctatus*, onde valores baixos de nitrato podem ocasionar efeitos subletais (Camargo et al. 2005).

Parâmetros Sanguíneos

No presente estudo, a exposição a diferentes concentrações de nitrato ocasionaram alterações nos parâmetros sanguíneos dos juvenis de tainha. A glicose é a principal fonte de energia para maioria das atividades nos peixes, sendo o glicogênio hepático uma importante reserva de energia que pode ser rapidamente mobilizado durante o estresse agudo (Ma et al. 2005).

As concentrações de glicose no plasma de *M. liza* apresentaram, nas concentrações mais elevadas (34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹), inicialmente uma diminuição e

com o passar do tempo (5 dias) aumentaram seus níveis em relação as concentrações mais baixas (controle e 8 mg NO₃-N L⁻¹). O mesmo foi observado por Sachar & Raina (2014) onde *Aspidoparia morar* expostos a três concentrações subletais de nitrato (0;5; 1,0 e 1,5 mg NO₃-N L⁻¹ - 2 meses) apresentaram hiperglicemia em todos os tratamentos. A diminuição da glicose, nos animais submetidos as concentrações mais elevadas de nitrato, está relacionada com a utilização dessa fonte energética para suprir o seu gasto energético. Contudo, com o passar do tempo e permanência dos níveis de estresse, após esta fonte se esgotar, o organismo passa a mobilizar o glicogênio hepático para manter os níveis de glicose no sangue aumentando seus níveis plasmáticos.

Entretanto, o catfish *Clarias gariepinus* (21, 59, 137 e 378 mg NO₃-N L⁻¹ - 42 dias) (Schram et al. 2012) e truta arco íris (20 a 40; 80 a 100 mg NO₃-N L⁻¹ - 3 meses) (Davidson et al. 2014) não apresentaram alterações nos níveis de glicose e hemoglobina.

Os valores de hematócrito da tainha, no presente estudo, não apresentaram alterações, o mesmo sendo observado para *C. gariepinus* (Schram et al. 2012) e para o salmão do atlântico *Salmo salar* (Davidson et al. 2017). Isto ocorre devido ao nitrato provavelmente não sofrer, ou este processo não ser significativo na oxidação de hemoglobina em metahemoglobina (Schram et al. 2012).

Os juvenis de tainhas, neste estudo, foram afetados pela exposição a 52 mg NO₃-N L⁻¹, havendo uma alteração nos níveis de eritrócitos. Resultados semelhantes foram verificados na espécie *Labeo rohita* expostas a níveis subletais de nitrito (0-15 mg N-NO₂ L⁻¹ - 96 h), onde ocorreu uma diminuição nos eritrócitos, devido a ocorrência de hemólise (Ciji et al. 2012).

O nitrato é conhecido por transformar a hemoglobina em metahemoglobina em animais aquáticos, conseqüentemente reduzindo a capacidade de ligação ao oxigênio e, finalmente, resultando em restrições respiratório-circulatórias (Camargo et al. 2005, Cheng & Chen 2002). Val (1993) verificou que alguns peixes aumentam a concentração de hemoglobina durante a hipóxia na tentativa de aumentar o volume de oxigênio no sangue. Essa afirmação pode explicar o aumento significativo na hemoglobina, após 5 dias de exposição ao nitrato em nosso estudo, demonstrando haver uma necessidade de captação de oxigênio pelo animal. Davidson et al. (2017), em estudo com salmão do Atlântico não evidenciou diferenças nas concentrações de hemoglobina plasmática na água doce, quando expôs os animais a 10 e 100 mg NO₃-N L⁻¹.

Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos podem ser utilizados na detecção de patologias e estresse, e, além disso, demonstram o estado fisiológico do animal. Estes índices estão relacionados com os valores de hematócrito e o número de eritrócitos; hematócrito e taxa de hemoglobina e a relação entre a taxa de hemoglobina e o número de eritrócitos (Grant 2015).

No presente estudo, os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) indicam que o volume de eritrócitos e a concentração de hemoglobina foram variáveis, provavelmente pela diminuição do volume dos eritrócitos atribuídos ao estresse tóxico da exposição ao nitrato. Entretanto, em estudo de Affonso et al. (2004), trabalhando com catfish *Hoplosternum littorale* expostos ao sulfeto de hidrogênio (0; 0,44-0,64 mg L⁻¹ - 96 h), não apresentaram diferença nos índices hematimétricos. Em outro estudo,

com catfish *Rhamdia quelen* expostos ao cádmio (0; 0,1; 1; 10 e 100 mg L⁻¹ - 15 dias), também não houveram alterações nos índices hematimétricos (Pereira et al. 2016).

Parâmetros bioquímicos

Alguns estudos já demonstraram que compostos nitrogenados no ambiente aquático induzem o estresse oxidativo nos tecidos de peixes, visto que podem ocasionar uma maior geração de radicais livres e/ou diminuição na atividade do sistema de defesa antioxidante, levando a um aumento nos níveis de dano oxidativo em diferentes macromoléculas e tecidos (Cheng et al. 2015; Ciji et al. 2012; Maltez et al. 2018; Yang et al. 2011).

Em nosso estudo, a exposição ao nitrato não induziu aumento no nível de dano oxidativo, exceto um leve dano nas brânquias dos animais expostos a concentração de 34 mg NO₃-N L⁻¹ em relação ao tratamento controle (1 dia). Resultado semelhante foi observado com juvenis de Turbot *Scophthalmus maximus* expostos a 0,4 e 0,8 mg N-NO₂ L⁻¹ de (96 h) (Jia et al. 2015) e Mudskipper *Boleophthalmus boddarti* expostos a 144 mg TAN L⁻¹ (48 h) (Ching et al. 2009). Este aumento na LPO induz ao aumento da atividade da GST, devido esta enzima atuar no processo de biotransformação, catalisando a conjugação de uma variedade de metabólitos, incluindo xenobióticos e produtos da LPO, minimizando os efeitos ocasionados através de sua atuação sobre os pró-oxidantes.

Este estudo mostrou que os níveis de nitrato aos quais os animais foram expostos durante 5 dias, não foram capazes de causar alterações nos níveis de LPO no fígado, isto ocorre devido as células hepáticas possuírem uma capacidade maior de detoxificar as ERO, desde os estágios iniciais da oxidação lipídica. Além disso, a redução da atividade

da GST observada na concentração de 52 mg NO₃-N L⁻¹ também pode explicar a diminuição nos níveis de LPO, uma vez que esta enzima apresenta um papel importante na detoxificação de produtos de dano oxidativo. Em contraste, Hegazi et al. (2010), expondo juvenis de Tilápia do nilo (5 e 10 mg TAN L⁻¹ - 70 dias), observaram um aumento no conteúdo de LPO no fígado destes animais.

A capacidade antioxidante total nas brânquias e fígado dos juvenis de tainha foram maiores nos animais expostos a 34 e 52 mg NO₃-N L⁻¹, o mesmo padrão sendo observado para *Paralichthys orbignyanus* expostos a amônia (0,28 e 0,57 mg NH₃-N L⁻¹ - 24 h)(Maltez et al. 2017). Isto ocorre, devido a uma resposta antioxidante do organismo para evitar um possível aumento da produção de ERO ou RNS. Além disso, esta maior atividade da ACAP no fígado ocorre devido a este ser o principal órgão detoxificador do organismo em relação aos xenobióticos. Em estudo com *Paralichthys orbignyanus* expostos ao nitrito (15 e 27 NO₂-N mg L⁻¹), contudo, foi observado uma redução na capacidade antioxidante total neste órgão durante o período de exposição e em concentrações de 5,72 e 10,43 mg NO₂-N L⁻¹ (Maltez et al.2018).

Entretanto, o músculo no presente estudo, apresentou uma menor capacidade antioxidante, resultando na utilização das defesas antioxidantes, o que possivelmente ocorreu devido ao aumento de radicais livres. Em estudo com *P. orbignyanus*, o mesmo foi observado, onde os animais expostos a 15,27 e 5,72 mg NO₂-N L⁻¹ apresentaram uma redução na capacidade antioxidante, no músculo, em comparação com o controle (Maltez et al. 2018), diferente do demonstrado em outras espécies (Da Rocha et al. 2009; Enamorado et al. 2015).

A atividade da GST nas brânquias, fígado e músculo de *M. liza*, no nosso estudo, apresentaram uma redução (5 dias), o que pode ser evidenciado como atuação desta

enzima na mitigação da toxicidade celular de uma série de produtos químicos endógenos e/ou ambientais (Hayes & Pulford 1995). Estes resultados indicam um aumento na produção de ERO resultando na utilização das defesas antioxidantes, incluindo a GST, para evitar ou reduzir o dano oxidativo.

Zhang et al. (2016), observaram o mesmo em estudo com juvenis de bagre *Pelteobagrus fulvidraco* submetidos a amônia total (3,36; 6,72; 13,44 e 26,88 mg TAN L⁻¹ – 56 dias), onde houve uma diminuição nas defesas antioxidantes enzimáticas no fígado e brânquias de acordo com o aumento das concentrações de amônia. Contudo, em estudos com *Labeo rohita* (3; 6; 9; 12 e 15 mg NO₂-N L⁻¹ – 96 h) (Ciji et al. 2012) e *Oreochromis niloticus* (5 e 10 mg TAN L⁻¹ - 70 dias)(Hegazi et al. 2010) houve um aumento da GST nas brânquias (*L. rohita*) e no fígado (*L. rohita* e *O. niloticus*).

Sendo assim, concluímos que a CL_{50-96h} para juvenis de tainha é de 606,07 mg NO₃-N L⁻¹ e, estes animais quando expostos ao nitrato, durante um período de cinco dias, apresentam alterações nos parâmetros sanguíneos, de estresse oxidativo e lipoperoxidação.

Referências Bibliográficas

AMADO LL, GARCIA ML, RAMOS PB, FREITAS RF, ZAFALON B, FERREIRA JL, YUNES JS AND MONSERRAT JM. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407: 2115–2123.

AFFONSO EG, POLEZ VLP, MAZON AF, ARAÚJO MRR, MORAES G AND RANTIN FT. 2004. Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (*Siluriformes Callichthyidae*). *Comp Biochem Physiol C* 139: 251-257.

BALDISSEROTTO B. 2013. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura, terceira ed. Editora da UFSM, Santa Maria.

BARTON BA. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* V. 4, P. 517–525.

BAUMGARTEN MG. Z; ROCHA JMB; NIENCHESKI LFH. 2010. Manual de Análises em Oceanografia Química. Editora da FURG. Rio Grande, RS. 5: 118-128 p

BELLÓ ARR, FORTES E, BELLÓ-KLEIN A, BELLÓ AA, LLESUY SF, ROBALDO RB AND BIANCHINI A. 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Dis Aquatic Organ* 42: 233-236.

BENDSCHNEIDER K AND ROBINSON RJ. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J Mar Res* 11: 87-96.

- CAMARGO JA, ALONSO A AND SALAMANCA A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58: 1255–1267.
- CHENG SY AND CHEN JC. 2002. Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid– base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicol* 61: 181–193.
- CHENG CH, YANG FF, LING RZ, LIAO SA, MIAO YT, YE CX AND WANG AL. 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquat Toxicol* 164: 61– 71.
- CHING B, CHEW SF, WONG WP AND IP YK. 2009. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (*mudskipper*). *Aquat Toxicol*. 95: 203–212.
- CIJI A, SAHU NP, PAL AK, DASGUPTA S AND AKHTAR MS. 2012. Alterations in serum electrolytes, antioxidative enzymes and haematological parameters of *Labeo rohita* on short-term exposure to sublethal dose of nitrite. *Fish Physiol Biochem* 38: 1355-1365.
- COLES EH. 1986. *Veterinary Clinical Pathology*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 10–42.
- DA ROCHA AM, DE FREITAS DP, BURNS M, VIEIRA JP, DE LA TORRE FR AND MONSERRAT JM. 2009. Seasonal and organ variations in antioxidant capacity, detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from Southern Brazil. *Comp Biochem Phys C Toxicol Pharmacol* 150: 512–520.
- DAVIDSON J, GOOD C, WELSH C AND SUMMERFELT ST. 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 AND SUMMERFELT ST. 2017. Evaluating the chronic effects of nitrate on the health and performance of post-smolt Atlantic salmon *Salmo salar* in freshwater recirculation aquaculture systems. *Aquacult. Eng* 79: 1-8.

EATON AD, CLESCERI LS, RICE EW AND GREENBERG AB. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition, Amer Public Health Assn.1325.

ENAMORADO AD, MARTINS AC, FLORES JA, TESSER MB, CALDAS SS, PRIMEL EG AND MONSERRAT JM. 2015 Biochemical responses over time in common carp *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) during fed supplementation with α -lipoic acid. *Comp Biochem Phys A Mol Integr Physiol* 188: 9-16.

FERNANDES C, FONTAÏNHAS-FERNANDES A, ROCHA E AND SALGANO MA. 2008. Monitoring pollution in E, smorzi-Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical effects in *Liza sapiens*. *Environ Monit Assess* 145: 315-322.

GOLDENFARB PB, BOWYER FP, HALL E AND BROSIOUS E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer J Clin Path* 56: 35-4923.

GRANT KR. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Vet Clin Exot Anim* 18: 83-103.

GRIM JM, MILES DRB AND CROCKETT EL. 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities

of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. J Exp Biol 213: 445–452.

GUILLETTE LJ AND EDWARDS TM. 2005. Is nitrate an ecologically relevant endocrine disruptor in vertebrates? Integr Comp Biol 45: 19 -27.

HABIG WH AND JAKOBY WB. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. Methods Enzymol 77: 398–405.

HABIG WH, PABST MJ AND JAKOBY WB. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249: 7130–7139.

HALLIWELL B AND GUTTERIDGE JM. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA

HAMILTON MA, RUSSO RS AND THURSTON RV. 1977. Trimmed Spearman Karber Method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. Environ Sci Technol 11: 714-719.

HAMLIN HL, MOORE BC, EDWARDS TM, LARKIN ILV, BOGGS A, HIGH WJ, MAIN KL AND GUILLETTE LJ. 2008. Nitrate-induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) in commercial aquaculture. Aquacult 28: 118–125.

HAYES JD AND PULFORD DJ. 1995. The glutathione-S-transferase super gene family: regulation of GST and the contribution of the iso enzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II. Crit Rev Biochem Mol Biol 30: 521–600.

HEGAZI MM, ATTIA ZI AND ASHOUR OA. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and White muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. Aquat Toxicol 99: 118–125.

KUHN DD, SMITH SA, BOARDMAN GD, ANGIER MW, MARSH L AND FLICK JR GJ. 2010. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquacult* 309: 109–114.

JIA R., HAN C, LEI JL, LIU BL, HUANG B, HUO HH AND YIN ST. 2015. Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquat Toxicol* 169: 1-9.

LEARMONTH C AND CARVALHO AP. 2015. Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of zebrafish—Setting nitrate safety levels for *zebrafish* rearing. *Zebrafish* 2: 305–311.

LIN Y et al. 2018. Effect of nitrite exposure on the antioxidant enzymes and glutathione system in the liver of bighead carp, *Aristichthys nobilis*. *Fish Shellfish Immunol* 76: 126-132.

LUO S, BENLI W, XIAOQIN X AND JIANWEI W. 2016. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to early life stages of the rare minnow (*Gobiocypris rarus*) *Environ. Toxicol Chem* 35: 1422-1427.

MALTEZ LC, STRINGHETTA GR, ENAMORADO AD, OKAMOTO MH, ROMANO LA, MONSERRAT JM, SAMPAIO LA AND GARCIA L. 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiol Biochem* 43: 1747-1759.

MALTEZ LC, BARBAS LA, NITZ LF, PELLEGRIN L, OKAMOTO MH, SAMPAIO LA, MONSERRAT JM AND GARCIA L. 2018. Oxidative stress and antioxidant responses in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* exposed to sublethal levels of nitrite. *Fish Physiol Biochem* 1-14.

- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ RM, MORALES AE AND SANZ A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol* 15: 75-88.
- MARTINS CIM, EDINGA EH, VERDEGEMA MCJ, HEINSBROEKA LTN, SCHNEIDER O, BLANCHETOND JP, ROQUE D'ORBCASTEL E AND VERRETH JAJ. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacult Eng* 43: 83–93.
- MENEZES NA AND FIGUEIREDO JL. 1985. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil.V. Teleostei (4). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 105p.
- NATT MP AND HERRICK CA. 1952. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science* 31: 735-738.
- OAKES KD AND KRAAK VD. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations. *Aquatic Toxicol* 63: 447-463.
- OKAMOTO MH, SAMPAIO LA AND MAÇADA AP. 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha (*Mugil platanus* Günther, 1980). *Atlântica* 28: 61-66.
- PEREIRA LS et al. 2016. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. *Ecotoxicol Environ Saf* 130: 29-36.
- PIEDRAHITA RH. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquacult* 226: 35–44.
- POERSCH LH, SANTOS MHS, MIRANDA-FILHO K AND WASIELESKY JR, W. 2007. Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). *Boletim do Instituto de Pesca* 33: 247–252.

- REIS EG AND D'INCAO F. 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort to wards community-based management. *Oc Coast Manage* 43: 585-595.
- RODRIGUES RV, SCHWARZ MH, DELBOS BC, CARVALHO EL, ROMANO LA AND SAMPAIO LA. 2011. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. *Aquacult* 322–323: 223–226.
- SACHAR A AND RAINA S. 2014. Effect of inorganic pollutant (Nitrate) on biochemical parameters of the fish, *Aspidoparia morar*. *Int J Inno Res Sci Eng Tech* 3: 12568-12573.
- SAMPAIO LA, WASIELESKY WB AND MIRANDA FILHO KC. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus* . *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology* 68: 668-674.
- SATHEESHKUMAR P, ANANTHAN G, SENTHILKUMAR D, KHAN AB AND JEEVANANTHAM, K. 2012. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. *Comp Clin Path* 21: 275-281.
- SCHRAM E, ROQUES JAC, ABBINK W, YOKOHAMA Y, SPANINGS T, VRIES P, BIERMAN S, VIS HV AND FLIK G. 2012. The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquacult Res* 45: 1499-1511.
- SPRAGUE JB. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish III. Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water Res* 5: 245-266.
- TAVARES-DIAS M AND MORAES FR. 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *J Fish Biol* 71: 383-388.

- UNESCO. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. 1983. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.
- VAL AL. 1993. Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh waters. In: Bicudo, J.E.P.W. (Ed.), The vertebrate gas transport cascade. Adaptations to environment and mode of life. CRC Press, USA.
- VALAVANIDIS A, VLAHOGIANNI T, DASSENAKIS M AND SCOULLOS M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Safe* 64: 178-189.
- VAN BUSSEL CGJ, SCHROEDER JP, WUERTZ S AND SCHULZ C. 2012. The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquacult Res* 326–329: 163–167.
- VAN RIJN J. 1995. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture--a review. *Aquacult* 139: 181 – 201.
- VAN RIJN J. 2013. Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacult Eng* 53: 49–56.
- VOSYLIENÉ, MZ. 1999. The effects of heavy metals on haematological indices of fish(Survey). *Acta Zoologica Lituanica*. V. 9, P.76-82.
- YANG W, SUN H, XIANG F, YANG Z AND CHEN Y. 2011. Response of juvenile crucian carp (*Carassius auratus*) to long-term ammonia exposure: feeding, growth, and antioxidant defenses. *J Freshw Ecol* 26: 563–570.
- ZHANG SY, LI G, WU HB, LIU XG, YAO YH, TAO L AND LIU H. 2011. An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: the effects on water quality and fish production. *Aquacul Eng* 45: 93–102.

ZHANG L, ZHAO ZG AND FAN QX. 2016. Effects of ammonia on growth, digestion and antioxidant capacity in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson, 1846). J App Ichthy 32: 1205–1212.

Tabela 1.

Parâmetros sanguíneos (média ± erro padrão) de juvenis de tainha (*Mugil liza*) expostas, por 5 dias, a diferentes concentrações de nitrato.

Parâmetros	Tratamentos	Tempo (dias)	
		1	5
Glicose (mg dL ⁻¹)	C	183,5±6,3 ^{Aa}	139,4±3,4 ^{Bb}
	8,0±2,0	182,6±6,4 ^{Aa}	141,0±4,05 ^{Bb}
	34,0±1,0	174,7±9,1 ^{ABb}	188,3±9,3 ^{Aa}
	52,0±6,0	157,0±10,8 ^{Bb}	199,2±2,2 ^{Aa}
pH (mmol L ⁻¹)	C	7,15±0,03 ^{Aa}	7,21±0,03 ^{Aa}
	8,0±2,0	7,14±0,03 ^{Aa}	7,22±0,02 ^{Aa}
	34,0±1,0	7,07±0,02 ^{Aa}	7,20±0,04 ^{Aa}
	52,0±6,0	7,08±0,02 ^{Aa}	7,31±0,06 ^{Aa}
Hematócrito (%)	C	43,4±2,07 ^{Aa}	49,3±1,95 ^{Aa}
	8,0±2,0	43,8±2,00 ^{Aa}	46,1±2,41 ^{Aa}
	34,0±1,0	42,6±1,87 ^{Aa}	45,9±2,15 ^{Aa}
	52,0±6,0	38,9±1,42 ^{Aa}	43,8±1,65 ^{Aa}
Eritrócito (%)	C	3,59±0,16 ^{Aa}	3,41±0,16 ^{Aa}
	8,0±2,0	3,51±0,24 ^{Aa}	3,44±0,19 ^{Aa}
	34,0±1,0	3,75±0,29 ^{Aa}	3,50±0,17 ^{Aa}
	52,0±6,0	2,71±0,18 ^{Bb}	3,69±0,11 ^{Aa}
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	C	5,57±0,44 ^{Aa}	5,84±0,43 ^{Da}
	8,0±2,0	6,73±0,31 ^{Ab}	7,99±0,14 ^{Ba}
	34,0±1,0	5,80±0,34 ^{Ab}	7,21±0,11 ^{Ca}
	52,0±6,0	3,01±0,22 ^{Bb}	8,90±0,24 ^{Aa}

VCM (g dL ⁻¹)	C	126,39±2,51 ^{Ab}	142,70±3,52 ^{Da}
	8,0±2,0	128,08±2,87 ^{Ab}	157,68±5,51 ^{Aa}
	34,0±1,0	131,87±5,41 ^{Aa}	134,42±1,36 ^{Ca}
	52,0±6,0	130,09±4,69 ^{Aa}	122,14±4,02 ^{Ba}
HCM (g dL ⁻¹)	C	17,37±0,46 ^{Ba}	17,06±1,51 ^{Ba}
	8,0±2,0	21,52±1,19 ^{Ab}	25,08±0,84 ^{Aa}
	34,0±1,0	15,61±0,89 ^{Bb}	22,78±0,51 ^{Aa}
	52,0±6,0	10,79±0,61 ^{Bb}	23,60±1,23 ^{Aa}
CHCM (g dL ⁻¹)	C	12,41±0,71 ^{Ca}	13,26±0,62 ^{Ba}
	8,0±2,0	17,17±1,13 ^{Aa}	17,50±0,99 ^{Aa}
	34,0±1,0	14,72±0,64 ^{Ba}	15,88±0,95 ^{Ba}
	52,0±6,0	12,76±0,92 ^{Cb}	19,25±1,11 ^{Aa}

Concentrações de nitrato (8,0±2,0; 34,0±1,0; 52,0±6,0 mg N-NO₃ L⁻¹) e um tratamento controle (C)(0,05 ±0,02 mg N-NO₃ L⁻¹). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos; e letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa entre os tratamentos no mesmo dia (Teste de Tukey, p <0,05, n = 9).

Legenda das figuras

Fig 1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas brânquias (a), fígado (b) e músculo (c) de juvenis de *Mugil liza* expostas ao nitrato. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo dia ($p < 0,05$).

Fig 2. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) (área relativa) nas brânquias (a), fígado (b) e músculo (c) de juvenis de *Mugil liza* expostas ao nitrato. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo dia ($p < 0,05$).

Fig 3. Atividade da Glutathione-S-transferase (GST) atividade nas brânquias (a), fígado (b) e músculo (c) de juvenis de *Mugil liza* expostas ao nitrato. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo dia ($p < 0,05$).

Figura 1

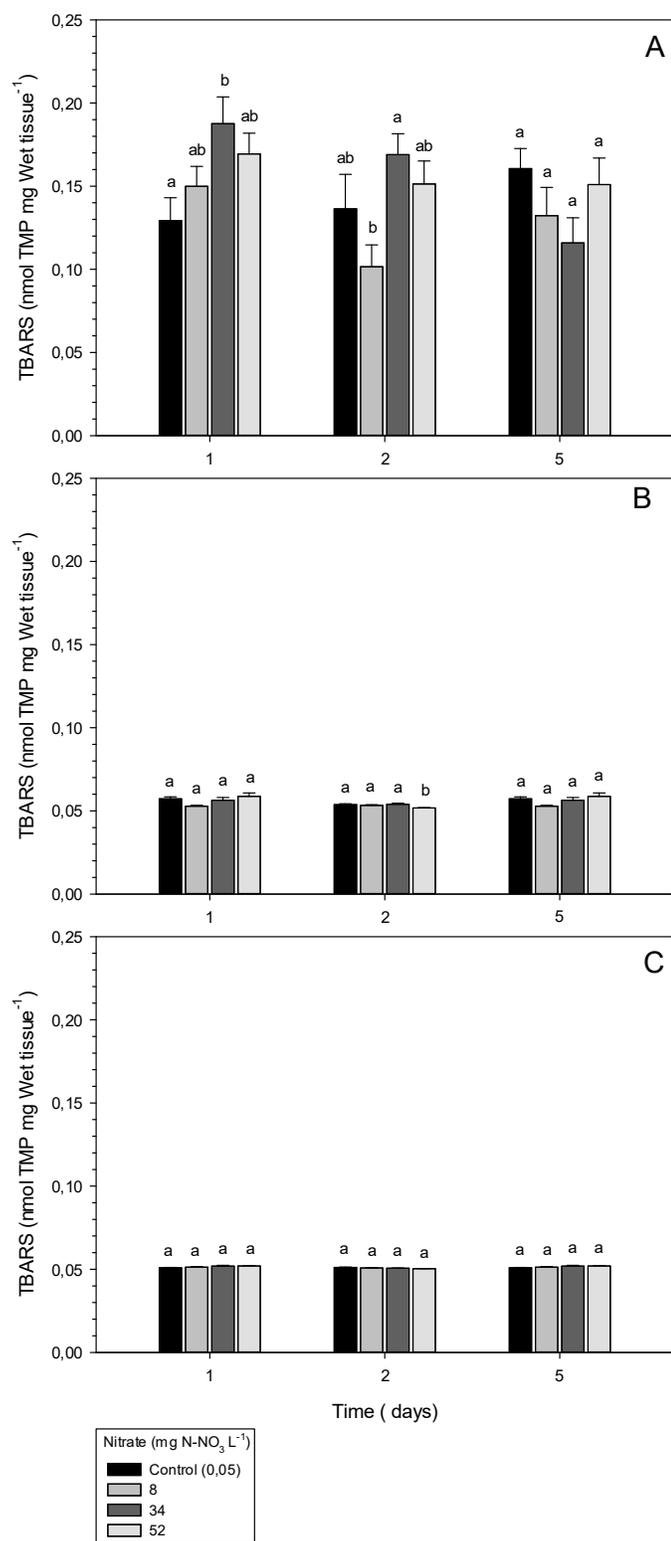


Figura 2

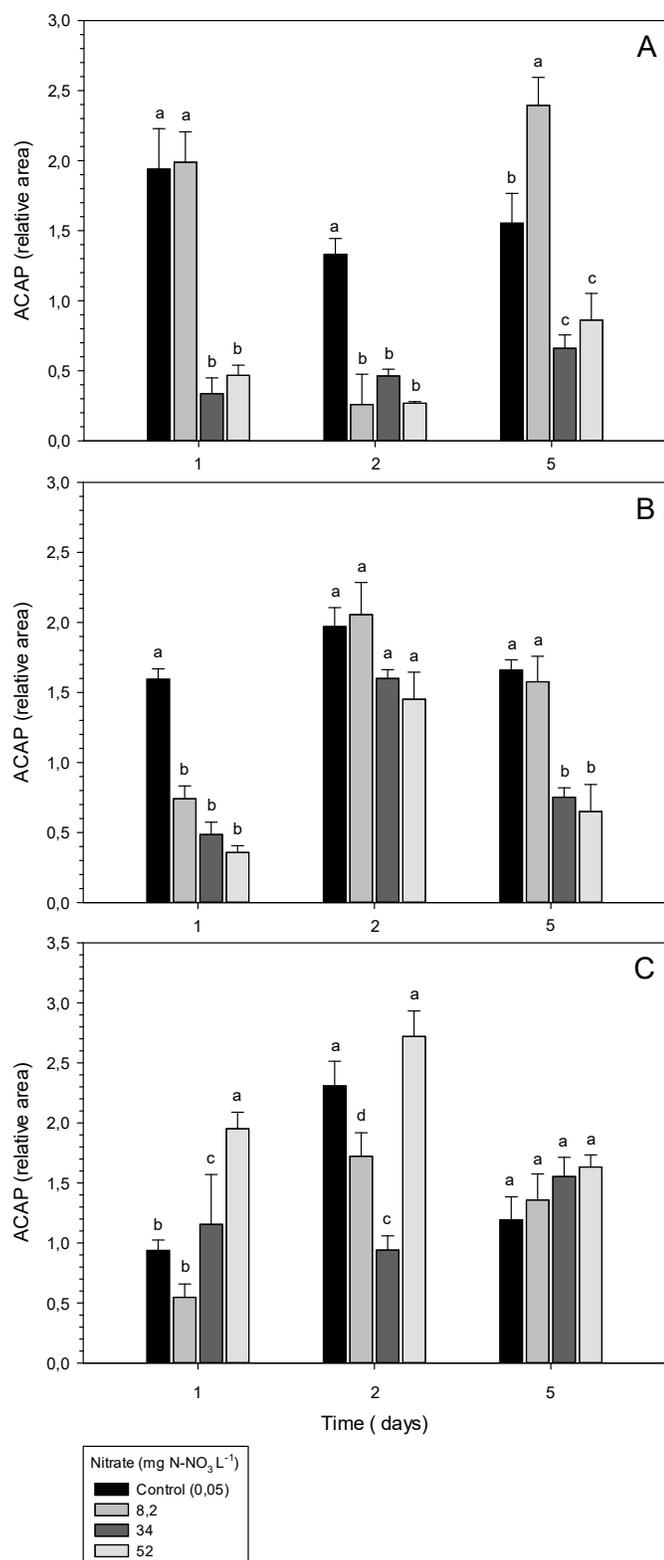
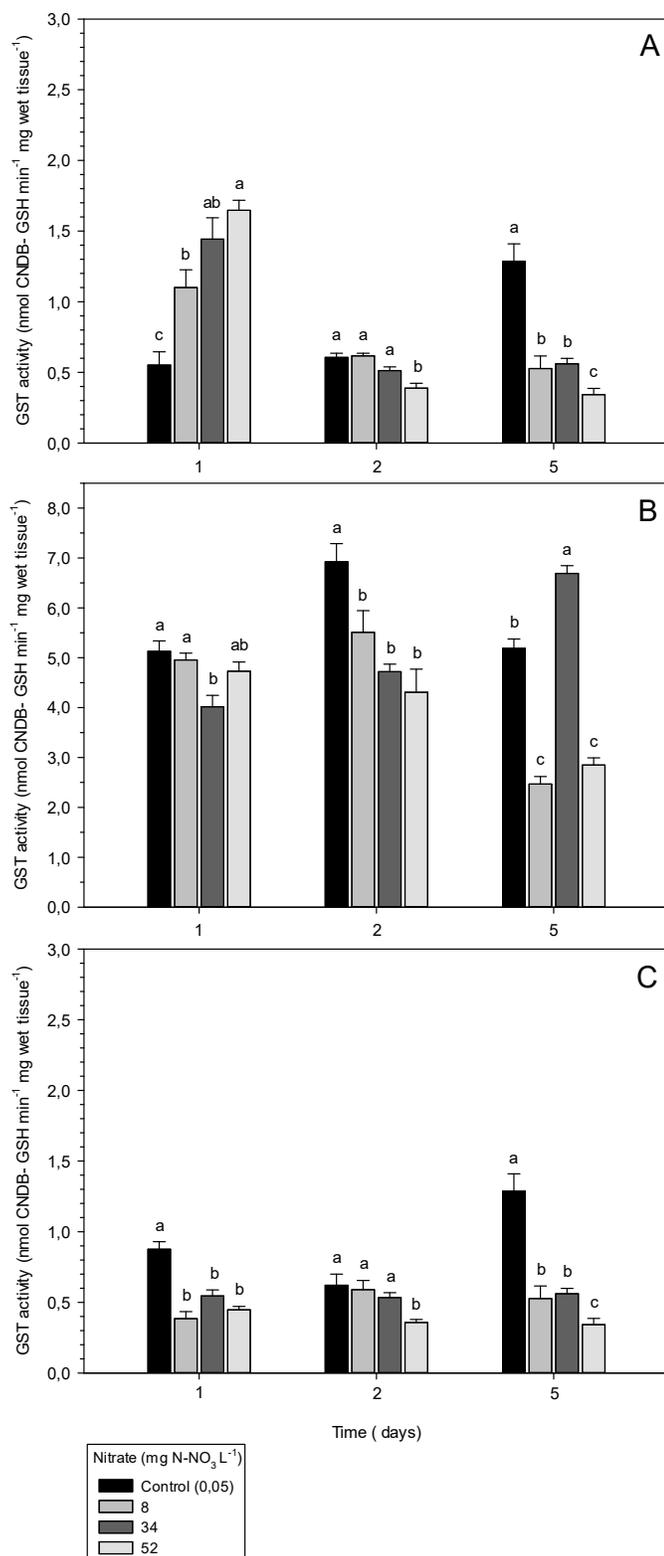


Figura 3



Conclusões Gerais

A concentração letal mediana CL_{50-96h} do nitrato foi estimada em 606,07 mg $NO_3-N L^{-1}$ (Intervalo de confiança - 459,19 a 799,93 mg $NO_3-N L^{-1}$) para juvenis de tainha na água doce.

A exposição aguda ao nitrato induziu a alterações nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, de estresse oxidativo e lipoperoxidação nos juvenis de tainha na água doce.