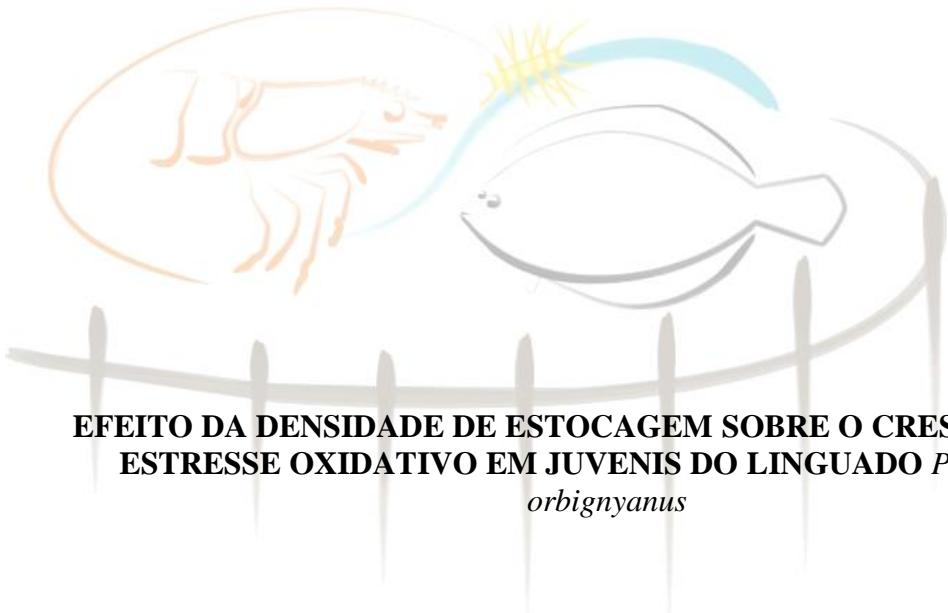




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



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

Joel Fitzgerald Linares Cordova

RIO GRANDE - RS

2019

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

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

JOEL FITZGERALD LINARES CORDOVA

Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

Co-orientador: Dra. Patrícia Baptista Ramos

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

RIO GRANDE - RS

2019

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

A minha co-orientador Dra. Patrícia Baptista Ramos, a qual me auxiliou em tudo tudo todo processo de análises bioquímicos, sempre disposta a me ajudar, me ensinar e sanar as minhas dúvidas.

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

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

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

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

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

Muito obrigado a TODOS.

MUITO OBRIGADO, BRASIL

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO GERAL	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	8
OBJETIVO GERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
HIPÓTESES.....	15
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 1: Effect of stocking density on growth performance and oxidative status in <i>Paralichthys orbignyanus</i> juveniles.....	29
CONCLUSÕES	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	68

RESUMO GERAL

A densidade de estocagem é amplamente reconhecida como um fator crítico na aquicultura. A influência da densidade de estocagem sobre o crescimento e resposta ao estresse em juvenis de linguado (*Paralichthys orbignyanus*, ~ 1.580 - 8.359g, peso inicial ao final) foi examinada em peixes mantidos em 50% PCA (82 peixes / tanque), 100% PCA (164 peixes / tanque), 150% PCA (246 peixes / tanque) e 200% PCA (328 peixes / tanque) durante 45 dias num sistema de recirculação de aquacultura (RAS). Neste estudo, diferenças significativas foram encontradas no desempenho de crescimento entre as quatro densidades. O peso final no tratamento com 200% PCA foi significativamente menor ($P < 0,05$) do que nos outros grupos, os juvenis de linguado brasileiro mantidos em 50% PCA atingiram $8,36 \pm 0,41$ g, enquanto aqueles mantidos em 200%PCA cresceram até $6,13 \pm 0,2$ g. Ao final do experimento, a taxa de crescimento específico (TCE) e a conversão alimentar (CA) também foram prejudicadas pela alta densidade populacional ($P < 0,05$). Da mesma forma, a densidade de estocagem induziu alterações que comprometeram o sistema antioxidante (atividade reduzida de ACAP e GST) e aumentaram o dano oxidativo nos lipídios. Aumentos na atividade de GST e no conteúdo de PSH também foram demonstrados. Em conclusão, juvenis de linguados brasileiros podem ser criados até 100% de PCA sem mostrar nenhuma sinal de estresse; enquanto, a densidade de estocagem chegou a 150% de PCA, o desempenho de crescimento e a resposta fisiológica foram adversamente afetados com uma tendência a aumentar a produção de radicais livres que poderiam danificar o sistema de defesa antioxidante.

Palavras-chave linguado brasileiro, aglomeração, enzimas antioxidantes, bem-estar

ABSTRACT

Stocking density is widely recognized as a critical factor in aquaculture. The influence of stocking density on growth and stress response of Brazilian flounder juvenile (*Paralichthys orbignyanus*, ~1.580 – 8.359g, initial to final weight) was examined in fish held 50% PCA (82 fish/tank), 100% PCA (164 fish/tank), 150% PCA (246 fish/tank) and 200% PCA (328 fish/tank) for 45 days in a recirculating aquaculture system (RAS). In this study, significant difference was found in growth performance among the four densities. The final weight in the 200% PCA treatment was significantly lower ($P<0.05$) than in other groups, flounder reared at 50% PCA reached 8.36 ± 0.41 g, while those reared at 200% PCA grew up to 6.13 ± 0.2 g. At the end of the trial, the specific growth rate (SGR) and feed conversion ratio (FCR) were also adversely affected by high stocking density ($P<0.05$). Similarly, stocking density induced alterations which compromised the antioxidant system (reduced ACAP and GST activity) and enhanced oxidative damage in lipids. Increases in GST activity and PSH contents were also demonstrated. In conclusion, Brazilian flounder juvenile can be reared up to 100 % PCA without showing any sign of stress; while, the stocking density reached up to 150% PCA, the growth performance and the physioloical response were adversely affected with a tendency to increase free radical production that could damage the antioxidant defense system.

Keywords: *Brazilian flounder*, crowding, antioxidant enzymes, welfar

1. INTRODUÇÃO

1.1. LINGUADO *Paralichthys orbignyanus*

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

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

O elevado valor comercial de algumas espécies de linguado motivou a criação desses peixes, que estão entre as principais espécies marinhas produzidas em cativeiro. Dados da FAO (2012) destacam a produção do turbot *Scophthalmus maximus*, que atingiu em 2010 pouco mais de 70.000 t.

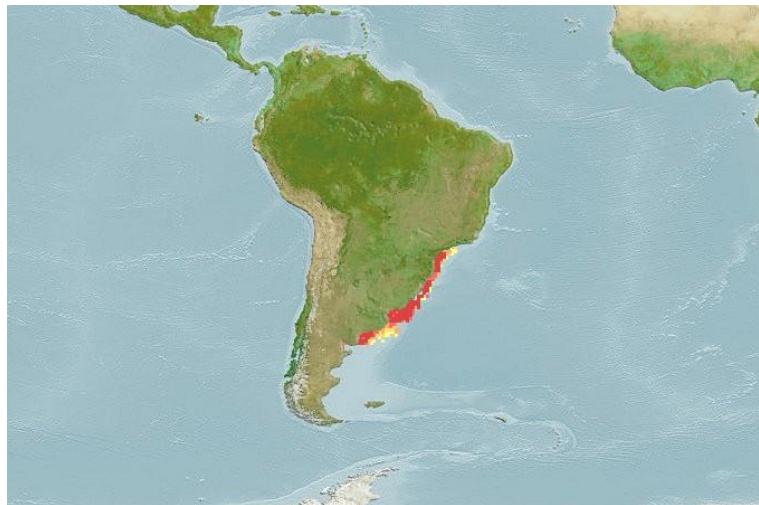


Figura 1. Distribuição geográfica e probabilidade relativa de ocorrência do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Fonte: FishBase).

1.2. DENSIDADE DE ESTOCAGEM

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

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

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

Rojas, 2009) devido na competição por alimento (Schwedler e Johnson, 2000; Kestemont e Baras, 2001), práticas inapropriadas de manejo alimentar (Kestemont e Baras, 2001). Finalmente, outro fator que pode causar a diminuição de desempenho em peixes submetidos a altas densidades de estocagem é o estresse (Schwedler e Johnson, 2000; Silva, 2010; Sanches, 2013). Em contraste, diversos autores relataram que o aumento das densidades de estocagem causa uma melhora nos índices de conversão alimentar, diminuição na heterogeneidade entre os peixes, e aumento da biomassa total (Watanabe et al., 1996a; Salaro et al., 2003; Ayroza et al., 2011); por conseguinte, determinam um maior retorno sobre os investimentos em estruturas e equipamentos (Hengsawat et al., 1997).

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

1.3.ESTRESSE

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

Moberg (1985), dividiu a resposta ao estresse em três fases: primeiro ocorre o desequilíbrio na homeostase; em seguida, o organismo reage em resposta ao estresse e,

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

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

Assim, uma densidade de estocagem inadequada gera um estado de estresse em peixes subordinados que provavelmente envolve o estado de medo e inibe a expressão do comportamento natural (Chandroo et al., 2004). Barton 2002, menciona que os peixes não conseguem se restabelecer num estresse intenso ou prolongado, podendo ocasionar consequências negativas para o seu estado de saúde. Exposições prolongadas a agentes estressores, que inicialmente não parecem problemáticos, podem se acumular havendo o risco de se tornarem letais para os indivíduos (Barton e Iwama, 1991; Conte, 2004). A distinção entre o estresse agudo e o estresse crônico é de extrema importância já que o primeiro geralmente ocorre durante o manejo dos animais ou pela ocorrência de contatos repentinos com situações estressantes que levem os peixes a um estresse rápido. Este, geralmente cessa com o final do estímulo e os peixes se reestabelecem. O estresse crônico, manifesta-se em condições as quais os peixes mantêm-se estressados permanentes e, como consequência, geralmente há queda no rendimento produtivo e/ou diminuição da resistência imunológica podendo inclusive gerar doenças e mortalidade (Silva, 2010; Sanches, 2013).

As respostas ao estresse podem ser apresentadas em: resposta primária, que envolve a liberação de catecolaminas e corticosteróides no sistema circulatório (Barton, 2002). As respostas secundárias são mudanças na gama de fatores bioquímicos, hematológicos e imunológicos (Frisch e Anderson, 2005). As respostas terciárias afetam o crescimento, a taxa metabólica, a resistência a doenças, a capacidade reprodutiva e sobrevivência (Barton e Iwama, 1991; Barton, 2002). Finalmente, para uma produção rentável é importante encontrar um limite entre o interesse econômico e a incidência de alterações fisiológicas (Bjornsson et al., 2012; Herrera et al., 2009).

1.3.1. Estresse Oxidativo

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

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

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

sistema de defesa antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutationa peroxidase (GPx), todas elas abundantes nos tecidos de peixes (Storey, 1996; Van der Oost et al., 2003).

A catalase descrita em 1901 por Loew (Frugoli et al., 1996), é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. A CAT é a única entre as enzimas degradantes de H₂O₂ que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o H₂O₂ formado nas células sob condições de estresse (Mallick e Mohn, 2000). Ocorrem primariamente nos peroxissomos e a proliferação peroxissômica é a principal causa para a elevação da atividade catalásica nos tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A glutationa peroxidase (GPx), é a principal peroxidase de peixes, uma enzima citosólica tetramérica, dependente de selênio, que emprega a glutationa reduzida (GSH) como co-fator. A GPx catalisa o metabolismo de um grande número de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e do H₂O₂ para água, envolvendo a oxidação concomitante da GSH para sua forma oxidada (GSSG). A GPx pode estar localizada no citosol, bem como na matriz mitocondrial, e divide com a catalase a habilidade para detoxificar o H₂O₂ (Martinez, 2006).

A enzima glutationa-S-transferase (GST) desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo agroquímicos. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutationa. Assim, animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a xenobióticos os quais sofrem detoxificação mediada pela glutationa na sua forma reduzida, catalisada pela enzima GST. Esta enzima de biotransformação tem sido estudada em trabalhos de campo no monitoramento de poluentes de origem industrial e agrícola (Cho et al., 1999; Fenet et al., 1998; Kantonieni et al., 1996).

A GSH está envolvida em várias funções fisiológicas: mantém os grupos SH das proteínas no estado reduzido, participa no transporte de aminoácidos e detoxificação de toxinas, atua enzimaticamente degradando peróxidos endógenos, forma moléculas bioativas e atua como coenzima em várias reações enzimáticas (Stamler e Slivka, 1996). A GSH participa ainda na decomposição do H₂O₂, potencialmente tóxico, que é convertido em H₂O em reação catalisada pela GPx, às custas da glutationa reduzida; a

glutatona oxidada resultante é reciclada à forma reduzida pela glutatona redutase e NADPH (Gul et al., 2000). O NADPH é regenerado pela via das pentoses fosfato, em reação catalisada pela glicose 6 fosfato desidrogenase, a qual é particularmente importante nos eritrócitos. Dessa forma, este processo de reciclagem e a manutenção de níveis adequados de GSH podem prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (Stamler e Slivka, 1996).

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

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes densidades de estocagem sobre o crescimento e na resposta ao estresse em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

3. HIPÓTESES

Densidades de estocagem altas são agentes estressores para os juvenis de linguado, resultando em crescimento más lento e induz o estresse oxidativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL E INSTALAÇÕES

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

4.2. MATERIAL BIOLÓGICO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado com 3280 juvenis de linguado *P. orbignyanus* ($1,58 \pm 0,28\text{g}$) provenientes da desova obtido no próprio LAPEM da FURG. Os peixes foram mantidos em 16 doze tanques de fibra de vidro com capacidade útil de 40 L a uma temperatura de $25,0 \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade de $27 \pm 4\%$ e sob um fotoperíodo de 18 horas claro e 6 horas escuro acoplados a quatro sistemas de recirculação de água independentes por 45 dias.

A densidade de peixes foi expressa em porcentagem da cobertura de área (PCA) em relação ao fundo do tanque. Peixes de comprimento total semelhante foram selecionados para serem transferidos para os tanques experimentais e sua área de superfície ventral (corpo do peixe incluindo todas as nadadeiras) e o comprimento total

foram estimadas por meio de análise de imagem (Image J), no início e no final do experimento.

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

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

4.3.PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

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

4.4. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

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

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

- a) Ganhão diário de peso: $GDP (\text{g peixe dia}^{-1}) = (B_t - B_0) / B_0 / T * 100$, onde B_t = biomassa de juvenis ao dia 45(g), B_0 = biomassa de juvenis ao inicio do experimento (g), T = tempo do experimento (dias).
- b) Taxa de crescimento específico diário: $TCE (\% / \text{dia}) = [(\ln p_f - \ln p_i) / t] \times 100$, onde p_i é o peso inicial (g), p_f é o peso final (g) e t é o tempo (dias);
- c) Conversão alimentar aparente: $CAA = AO / GP$, onde AO é a quantidade de alimento oferecido (g) e GP é o ganho de peso dos peixes (g);

- d) Porcentagen de cobertura de área (%PCA): $PCA = (AST * N * 100) / A$, onde AST é a área de superfície total dos peixes, N é a quantidade de peixes, A é a área disponible para el cultivo (cm^2);
- e) Fator de condição: $FC = pf / cf^3$, onde pf e cf são respectivamente o peso e o comprimento final.
- f) Coeficiente de variação (CV_{BW}) = $100 * (DP / BW)$, onde DP é o desvío padrão e BW é a média do peso (g)

4.5. MEDIÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

4.5.1. Amostragem e Homogeneização de órgãos

Para realizar os parâmetros bioquímicos, 12 indivíduos de cada tanque foram aleatoriamente removidos ao final do experimento, e foram imediatamente sacrificados com uma dose letal de cloridrato de benzocaína (500 ppm) e amostras de brânquias, fígado, cérebro e músculo foram coletadas, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer (-80 ° C) para posterior análise. Amostras de tecido branquial, hepático, cerebral e muscular foram homogeneizadas (1: 5; p / v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,75) com EDTA (2 mM) e MgCl₂.6H₂O (5 mM) (Rocha et al., 2009). Os sobrenadantes resultantes da centrifugação dos homogeneizados (20000 x g, 20 minutos, 4°C) foram utilizados para as análises. A quantificação da proteína total foi realizada pelo método de Biuret ($\lambda = 550$ nm) em triplicata, utilizando um leitor de microplacas (Biotek Synergy HT), como realizado em estudos anteriores (Amado et al., 2009). A média da concentração protéica (\pm erro padrão) dos tecidos foram, respectivamente: brânquias ($14,03 \pm 0,35$ mg / mL), fígado ($27,67 \pm 1,00$ mg / mL), cérebro ($4,82 \pm 0,16$ mg / mL) e músculo ($18,06 \pm 0,51$ mg / mL).

4.5.2. Medição da capacidade antioxidante total (ACAP)

O ACAP foi detectado de acordo com o método descrito por Amado et al. 2009. Baseia-se na detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em amostras com presença ou ausência de cloridrato de 2,2-azobis2 metilpropionamidinedihidroclorido (ABAP, 4 mM), que a 37 °C gera radicais peroxil. Todas as amostras foram fixadas em 2,0 mg de proteína mL⁻¹. Para a determinação de ROS 2 ' 7-diclorofluoresceína diacetato - H₂DCF-

DA, utilizou-se uma concentração final de 40 mM. As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas de fluorescência Biotek Synergy HT (excitação: 485 nm; emissão: 520 nm) com leituras a cada 5 minutos, durante 35 minutos. Os resultados foram expressos como uma área relativa (a diferença entre a área de ROS com e sem ABAP em relação à sem ABAP). Para fins de interpretação dos resultados, uma área relativa maior significa menor capacidade antioxidante e vice-versa (Monserrat et al. 2014).

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

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

4.5.4. Medição da glutationa reduzida intracelular (GSH)

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

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

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

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

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

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

utilizando o pacote computacional STATISTIC 7 e as figuras foram feitas usando o GraphPad Prism versão 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMROTH, B.C., STURVE, J., BERGLUND, A., FÖRLIN, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic toxicology** 73, 171–80.
- AMADO, L.L., LONGARAY GARCIA, M., RAMOS, P.B., FREITAS, R.F., ZAFALON, B., RIBAS FERREIRA, J.L., YUNES, J.S., MONSERRAT, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Sci Total Environ** 407, 2115–2123.
- ANDRADE, T., AFONSO, A., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., OLIVA-TELES, A., DE LAS HERAS, V., MANCERA, J.M., SERRADEIRO, R., COSTAS, B., 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral imune parameters and oxidative status. **Aquaculture** 438, 6-11.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G.A., MORAES, G., 2009. Interação do exercício de natação sustentada e da densidade de estocagem no desempenho e na composição corporal de juvenis de matrinxã *Brycon amazonicus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n1, p.201-208.
- AYROZA, L. M. S., ROMAGOSA, E., AYROZA D. M. M. R., SCORVO FILHO J. D., SALLES F. A., 2011. Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia-donilo em tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.2, p.231-239.
- BARATA, C., VARO, I., NAVARRO, J.C., ARUN, S., PORTE, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology C** 140, 175–86.
- BARTON B. 2000. Stress. Pages 892-898 in R.R. Stickney, editor. Encyclopedia of aquaculture. John Wiley and Sons, Inc., New York, New York, USA.

- BARTON, B., 2002. Stress in Fish: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, 42: 517 – 255.
- BARTON, B.A., IWAMA, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, 1: 3 - 26.
- BENDSCHNEIDER, K., ROBINSON, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. **Journal of Marine Research**, 11:87-96.
- BENOVIT, S.C., GRESSLER, L.T., SILVA, L.L., GARCIA, L.O., OKAMOTO, M.H., PEDRON, J.S., SAMPAIO, L.A., RODRIGUES, R.V., HEINZMANN, B.M., BALDISSEROTTO, B., 2012. Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 43: 896 - 900.
- BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R., 1997. Protein Oxidation in aging, disease, and oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry** 272 (33), 20313-20316.
- BIANCHINI, A., ROBALDO, R.B., SAMPAIO L. A. 2010 Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*). In: BALDISSEROTTO B. e GOMES L. C. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. **Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria**, 559 - 587.
- BISWAS, G., GHOSHAL, T.K., NATARAJAN, M., THIRUNAVUKKARASU, A.R., SUNDARAY, J.K., KAILASAM, M., DE, D., SUKUMARAN, K., KUMAR, P., PONNIAH, A.G., 2013. Effects of stocking density and presence or absence of soil base on growth, weight variation, survival and body composition of pearlspot, *Etroplus suratensis* (Bloch) fingerlings. **Aquaculture Research** 44, 1266–1276.
- BJÖRNSSON, B., STEINARSSON, A., ODDGEIRSSON, M., ÓLAFSDÓTTIR, S.R., 2012. Optimal stocking density of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared in a land-based farm. **Aquaculture**, 356: 342 – 350.
- BOLASINA S. 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. **Aquaculture**, 313: 140 - 143.
- BOLASINA S., TAWAQA M., YAMASHITA Y., TANAKA M. 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, 259: 432 - 443.

- CASTILLO VARGAS MACHUCA S., PONCE PALAFOX J., GARCIA ULLOA M., ARREDONDO FIGUEROA J., RUIZ LUNA A., CHAVEZ E., TACON A. 2012. Effect of stocking density on growth performance and yield of subadult Pacific Red Snapper cultured in floating sea cages. **North American Journal of Aquaculture**, 74: 413 – 418.
- CATTANEO, R., CLASEN, B., LORO, V.L., MENEZES, C.C., MORAES, B., SANTI, A., TONI, C., AVILA, L.A., ZANELLA, R., 2011. Toxicological responses of Cyprinus carpio exposed to the herbicide penoxsulam in rice field conditions. **Journal of Applied Toxicology** 31, 626-632.
- CHANDROO, K.P., COOKE, S.J., MCKINLEY, R.S., MOCCIA, R.D., 2005. Use of electromyogram telemetry to assess the behavioral and energetic responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress. **Aquaculture Research** 36, 1226-1238
- CHEN, W., ZHAO, Y., SEEFELDT, T., GUAN, X., 2008. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. **J Pharm Biomed Anal** 48 (5), 1375–1380
- CHO J.R.; KIM Y. J.; HONG K. J.; YOO J. K.; LEE J.O.; AHN Y. J.; CHO J.R.; KIM Y.J.; HONG K.J.; YOO J.K.; LEE J.O.; AHN Y.J, 1999. Resistance monitoring and enzyme activity in field-collected populations of the spiraea aphid, *Aphis citricola* Van der Goot. **J. Asian Pacific Entomol.** 2: 113-119
- CONTE, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 86, 205- 223.
- DOU, S., MASUDA, R., TANAKA, M., TSUKAMOTO, K., 2004. Size hierarchies affecting the social interactions and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture** 233, 237–249.
- DORVAL, J., LEBLOND, V., DEBLOIS, C., HONTELÀ, A., 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry** 24(5), 1273–1280.
- EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W., GREENBERG, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, **21st edition American Public Health Association**, Washington.

- FAIRCHILD, E., HOWELL, W.H., 2001. Optimal stocking density for juvenile winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 32(3): 300 – 308.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture – Contributing to food security and nutrition for all. Rome.
- FENET, H.; CASELLAS, C.; BONTOUX, J., 1998. Laboratory and field caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow trout. **Ecotox. Environ. Safety**. 40:137-143
- FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Museu de Zoologia / USP, São Paulo.
- FRISCH A., ANDERSON T. 2005. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, 140: 317 - 327.
- FRUGOLI, J.A.; ZONGH, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; MCCLUNG, C.R, 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiol.** 112: 327-336.
- GARCIA, E., CORZO, A., PAPASPYROU, S. 2014. A fasr and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. **Marine Chemistry** 162, 30 - 36.
- GARCIA L. O., OKAMOTO M. H., RIFFEL A. P. K., SACCOL E. M., PAVANATO M. A., SAMPAIO L. A. 2015. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes,1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, 13: 607 - 612.
- GUL, M.; KUTAY, F. Z.; TEMOCIN, S.; HAANNINEN, O., 2000. Cellular and Clinical implications of glutathione. **Ind. J. Exper. Biol.** 38: 625-634
- GUO, H.Y., DONG, X.Y., ZHANG, X.M., ZHANG, P.D., LI, W.T., 2017. Survival, growth and physiological responses of juvenile japonese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schelegel, 1846) exposed to different dissolved oxygen concentrations and stocking densities. **J. Appl. Ichthyol.** 33 (4), 1-9

- HABIG W. H., JAKOBY W. B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, 77: 398 – 405.
- HALLIWEL B., GUTTERIDG J. M. 2015. Free radicals in biology and medicine, Fifth edition. Oxford University Press, EUA.
- HENGSAWAT K., WARD F.J., JARURATJAMORN P. 1997. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. **Aquaculture**, v.152, p.67-76.
- HERRERA, M., VARGAS CHACOFF, L., HACHERO, I., RUÍZ JARABO, I., RODILES, A., NAVAS, J.I., MANCERA J.M., 2009. Physiological responses of juvenile wedge sole *Dicologoglossa cuneata* (Moreau) to high stocking density. **Aquatic Research**, 40: 790 – 797.
- HUANG, C.H., CHANG, R.J., HUANG, S.L., CHEN, W.L., 2003. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Comparative Biochemistry and Physiology B** 134, 265– 270.
- IRWIN, S., O' HALLORAN, J., FITZGERALD, R.D. 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). **Aquaculture**, 178: 77 – 88.
- JOBLING M., BAARDVIK B. M., CHRISTIANSEN J. S., JORGENSEN E. H. 1994. The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish. **Aquaculture International**, v.1, p.95-111.
- KANTONIEMI, A.; KIRSI, V.; OIKARI, A., 1996 The capacity of liver microsomes to form benzo(a)pyrene-diolepoxyde DNA adducts and induction of cytochrome P450 1A in feral fish exposed to pulp mill effluents. **Ecotox. Environ. Safety** 35, 136-141.
- KESTEMONT P., BARAS E. 2001. Environmental factors and feed intake: mechanisms and interactions. In. HOULIHAN, D. *et al.* Food intake in fish. Oxford-UK: Blackwell-science. Chap.6, p.131-145.
- KING, N., HOWELL, W.H., FAIRCHILD, E., 1998. The effect of stocking density on the growth of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*. In: Howell W.H., Keller B.J., Park P.K., McVey J.P., Takayanagi K., Uekita Y. (Eds.), U.S. – Japan Aquaculture Symposium, Durham, New Hampshire (USA), 16 – 18 Sep 1997, **Nutrition and Technical Development of Aquaculture**, 26: 173 – 180.

- LACKNER, R., 1998. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. *Fish Ecotoxicology*, 203–224
- LIU, B., JIA, R., HAN, C., HUANG, B., LEI, J.L., 2016. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 190, 1-8.
- LOUZADA, L.R., 2004. Efeito do fotoperíodo na sobrevivência e crescimento de larvas de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Dissertação de mestrado. FURG.
- MALTEZ, L., RODRIGUES, G., ENAMORADO, A., OKAMOTO, M., ROMANO, L., MONSERRAT, J., SAMPAIO, L., GARCIA, L., 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Fish Physiology Biochemical**, 43(6): 1747 – 1759.
- MALLICK, N., MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **J. Plant Physiol.** 157: 183-193, 2000
- MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura, Jaboticabal – S.P: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, p.81-95, 2006.
- MCKENZIE, D. J., HÖGLUND, E., DUPONT-PRINET, A., LARSEN, B. K., SKOV, P.V, PEDERSEN, P. B., JOKUMSEN, A. 2012. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. **Aquaculture**, 338–341, 216–222.
- MERINO G., PIEDRAHITA R., CONKLIN D. 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. **Aquaculture**, 265: 176 - 186
- MILLNER R., WALSH S. J., DIAZ DE ASTARLOA J. M. 2005. Atlantic flatfish fisheries. In: Gibson, R. N., Nash, R. D. M., Geffen, A. J., Van Der Veer, H. W. (Eds.), Flatfishes: Biology and Exploitation. **Blackwell Science Ltd**, Oxford, 240-271.
- MOBERG, G.P., 1985. Biological response to stress: Key to assessment of well-being? In: MOBERG, G. P. (ed.) Animal stress. Bethesda: American Physiological Society, 27-29.

- MONSERRAT, J.M., GARCIA, M.L., VENTURA-LIMA, J., GONZALEZ, M., BALLESTEROS, M.L., MIGLIORANZA, K.S., AME, M.V., WUNDERLIN, D.A., 2014. Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia multidentata* (Anablapidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. **Pestic Biochem Physiol** 108,8–15.
- NIEUWEGIESSEN P. G. Van de, BOERLAGE A. S., VERRETH J. A. J., SCHRAMA J. W. 2008. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. **Applied Animal Behaviour Science**, v.115, p.233-243.
- OAKES K. D, VAN DER KRAAK G. J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, 63: 447 - 463.
- OKAMOTO M. H., SAMPAIO L. A. 2012. Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. **Atlântica** 34: 57-61.
- PICKERING, A.D., 1981. Stress and fish. London: Academic Press
- REQUENA, J.R., LEVINE, R.L., STADTMAN, E.R., 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids** 25, 221–226
- ROBALDO R. B., RODRIGUES R. V., OKAMOTO M. H., SAMPAIO L. A. 2012. Processing yield of wild caught and indoor reared Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Applied Ichthyology**, 28: 815 - 817.
- SALARO A. L., LUZ R. K., NOGUEIRA G. C. C., NOGUEIRA G. C. C. B., REIS A., SAKABE R., LAMBERTUCCI D. M. 2003. Effect of two stocking rates on the traírao (Hoplitas cf. lacerdae) fingerlings performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1033- 1036.
- SHRECK, C.B., 2010. Stress and reproduction: the roles of allostasis and hormesis. **Gen. Comp. Endocrinol.** 165, 549–556.
- SAMPAIO L. A., BIANCHINI A. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 269: 187 – 196.

- SAMPAIO L. A., FREITAS L. S., OKAMOTO M. H., LOUZADA L. R., RODRIGUES R. V., ROBALDO R. B. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. **Aquaculture**, 262: 340 - 346.
- SAMPAIO L. A., ROBALDO R. B., BIANCHINI A. 2008. Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). **Aquaculture Research**, 39: 712 - 717.
- SCHWEDLER, T.E., JOHNSON, S.K., 2000. Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. **Animal Welfare Information Center Bulletin** 10, p.3-4
- SILVA, R.D., 2010. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
- STEGEMAN, J.J.; BROWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FORLIN, B.; FOWLER, B.; SANDERS, B.; VAN VELD, P., 1992. Molecular responses to environmental contamination: Proteins and enzymes as indicators of contamination exposure and effects. In Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress (R. J. Huggett, Ed.), pp. 235–335. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl.
- STOREY, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Hist. Res.** 96:1715-1733.
- SWANN, J.D., SMITH, M.W., PHELPS, P.C., MAKI, A., BEREZESKY, I.K., TRUMP, B.F., 1991. Toxicologic Pathology.
- TURNBULL J., BELL A., ADAMS C., BRON J., HUNTINGFORD F. 2005. Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. **Aquaculture**, v.243, p.121-132.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commissiony. Paris.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 13, 57-149

- VIJAYAN M.M., BALLANTYNE J.S, LEATHERLAND J.F. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. **Aquaculture**, v.88, p.371-381.
- WANG, Y., CHI, L., LIU, Q., XIAO, Y., MA, D., XIAO, Z., MA, D., XIAO, Z., XU, S., LI, J., 2018. Effects of stocking density on the growth and immunity of Atlantic salmon *Salmo salar* reared in recirculating aquaculture system (RAS). **J. Ocean. Limnol.** 36, 1–11.
- WASIELESKY W., BIANCHINI A., SANTOS M. H., POERSCH L. H. 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. **Journal of the World Aquaculture Society**, 28: 202 - 204.
- WATANABE, W.O., SMITH, S.J, HEAD, W.D., MUELLER, K.W., 1996A Production of florida red tilapia (*Oreochromis* sp.) In brackish water tanks under differents feeding regimes and stocking densities. In: the third international symposium on tilapia in aquaculture, n.15th, 1996, manila. Iclarm conference proceedings. Manila: department of fisheries, international center for living aquatic resources management, 160-167
- WHITE, C.C., VIERNES, H., KREJSA, C.M., BOTTA, D., KAVANAGH, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Anal Biochem** 318, 175-180

CAPITULO I

Effect of stocking density on growth performance and oxidative status in *Paralichthys
orbignyanus* juveniles

Artigo formatado para submissão na revista *Aquaculture*

Abstract

Stocking density is widely recognized as a critical factor in aquaculture. The influence of stocking density on growth and stress response of Brazilian flounder juvenile (*Paralichthys orbignyanus*, ~1.580 – 8.359g, initial to final weight) was examined in fish held 50% PCA (82 fish/tank), 100% PCA (164 fish/tank), 150% PCA (246 fish/tank) and 200% PCA (328 fish/tank) for 45 days in a recirculating aquaculture system (RAS). In this study, significant difference was found in growth performance among the four densities. The final weight in the 200% PCA treatment was significantly lower ($P<0.05$) than in other groups, flounder reared at 50% PCA reached 8.36 ± 0.41 g, while those reared at 200% PCA grew up to 6.13 ± 0.2 g. At the end of the trial, the specific growth rate (SGR) and feed conversion ratio (FCR) were also adversely affected by high stocking density ($P<0.05$). Similarly, stocking density induced alterations which compromised the antioxidant system (reduced ACAP and GST activity) and enhanced oxidative damage in lipids. Increases in GST activity and PSH contents were also demonstrated. In conclusion, Brazilian flounder juvenile can be reared up to 100 % PCA without showing any sign of stress; while, the stocking density reached up to 150% PCA, the growth performance and the physioloical response were adversely affected with a tendency to increase free radical production that could damage the antioxidant defense system.

Keywords: *Brazilian flounder*, crowding, antioxidant enzymes, welfare

1. Introduction

Stocking density is important for aquaculture, since if it is lower than optimal, production is not maximized, on the other hand, when crowded in excess, fish performance will be poor, due to physiological responses to cope with stress, which may reduce feed consumption (Wang et al. 2018, Guo et al. 2017, McKenzie et al. 2012, Sanchez et al. 2011), decrease immunological competence (Liu et al. 2016, Andrade et al. 2015), thus leading to health issues and resulting in reduced growth rates due to the behavior of fish related to social interactions (hierarchy, territorialism) influenced by inadequate densities in aquaculture production (Bolasina et al. 2006, Dou et al. 2004, Irwin et al. 1999). Therefore, the determination of the optimal stocking density will allow the farmer to produce the largest number of fish in a certain facility, therefore achieving the highest productivity optimizing in this way the economic benefits and their feasibility in the development of commercial production (Biswas et al. 2013, Castillo Vargas et al. 2012).

It is important to study stocking density for flatfish looking at both biomass per unit of bottom area and as a percentage of coverage area (PCA) due to the demersal characteristics of this group of fishes (Merino et al. 2007, Labatut and Olivares 2004). There are some studies about the effect of stocking density on growth on different flatfish species. Growth of *Paralichthys dentatus* is improved when the stocking density is reduced from 200% to 100% PCA (King et al. 1998). Also, for *Scophthalmus maximus* it was reported that at higher densities the growth rates are slower due to increased competition for food (Irwin et al. 1999). Fairchild and Howell (2001) indicate that juveniles of *Pseudopleuronectes americanus* could be reared up to 200% and possibly 300% PCA without harming growth, but fish become more stressed and at higher risk of disease. Merino et al. (2007) mention that juveniles of *Paralichthys californicus* raised to

100% PCA grew faster than those raised at 200% and 300% PCA. Finally, according to what has been described above, the optimal stocking density for producing flatfish would be between 100 to 200% PCA.

Stress is the physiological cascade of events that occurs when fishes is attempting to resist death or reestablish homeostasis (Shreck 2010). An oxidative stress scenario is when exist an imbalance between pro-oxidants and antioxidant defenses (Halliwell and Gutteridge, 2015). In fish culture, the reactive oxygen species (ROS) formation can be influenced by several factors, such as variations of dissolved oxygen concentrations (Pelster et al. 2018), food restriction (Morales et al. 2004), ammonia and nitrite exposure (Maltez et al. 2017, Maltez et al. 2018), variations in temperature (Ibarz et al. 2010, Castro et al. 2012), and overcrowding (Guo et al. 2017, Liu et al. 2016, Pérez-Sánchez et al. 2013) among other factors. In that sense, when organisms become stressed, the mechanism for reducing cell damage and protect themselves from oxidative stress is inducing antioxidant defense systems. Furthermore, the non-enzymatic antioxidant defenses such as reduced glutathione (GSH), which plays an important role in preventing, retarding or removing oxidative damage to target molecules (Halliwell and Gutteridge 2015). Finally, to guarantee an economical feasibility, it is important to find a balance between economic interest and the incidence of physiological changes without compromising their welfare profit (Bjornsson et al. 2012).

Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) is a flatfish species candidate for aquaculture in South America (Millner et al. 2005). It tolerates a wide range of temperature, salinity and pH, and also copes well with ammonia and nitrite toxicity (Bianchini et al. 1996, Wasielesky et al. 1997, Sampaio and Bianchini 2002, Okamoto and Sampaio 2012, Maltez et al. 2017, Maltez et al. 2018) and handling (Bolasina 2011).

In addition, spawning, larviculture and juvenile production have been successfully achieved (Sampaio et al. 2007, Sampaio et al. 2008). However, to our knowledge, there is no information on the influence of stocking density on this species culture. Therefore, the present study was designed to evaluate the effect of different stocking densities on growth and the oxidative status of Brazilian flounder juveniles and the information gained should be applicable to industrial flounder farming operations.

2. Materials and Methods

2.1. Fish and experimental conditions

Brazilian flounder juveniles were produced and reared at the Laboratory of Marine Fish Culture of the Federal University of Rio Grande - FURG. The experimental protocol was approved by the Committee on Animal Experimentation of FURG under the registration number 23116.002018/2018-81.

Fish were reared at four stocking densities: 50, 100, 150, and 200 % PCA; using 82, 164, 246 and 328 fish per tank respectively, with four replicates each, for a period of 45 days. Densities were calculated based on the ventral fish area to bottom tanks area ratio. To measure density, mean fish ventral surface area was estimated by image analysis (Merino 2007). The juveniles ($1.58 \pm 0.28\text{g}$) were reared in 40 L circular tanks ($\pm 30\text{ cm}$ water depth), with a 1256.64 cm^2 bottom surface area. During the experiment alperiod, temperature was $25.0 \pm 0.3\text{ }^\circ\text{C}$ and the photoperiod was maintained at 18 hour light/6 hour dark.

Fish were hand-fed *ad libitum* five times a day (7:30, 11:15, 15:00, 18:45 and 22:30 h) using a commercial diet (INVE Orange 2mm) with 55% protein, 13% fat, 13.5% ash, and

1% fiber). Uneaten food and feces were siphoned out after feeding and new water was used to refill the tanks.

Water quality parameters were measured daily before the first feeding: temperature and dissolved oxygen (oximeter YSI 55), salinity (refractometer, ATAGO® PAL-06S), pH (pH meter, WTW 315 i), total ammonia (UNESCO 1983), nitrite (Bendschneider and Robinson 1952) and total alkalinity (Eaton et al 2005).

2.2. Growth parameters

Fish were weighed and measured ($n = 35$ per tank) at the beginning and at the end of the experiment. Data on initial weight, final weight, total length, and feed intake were used to calculate, daily weight gain (DWG), condition factor (K), final percentage of covered area (PCA), and specific growth rate (SGR) as follows:

$$\text{DWG} = (B_t - B_0) / B_0 / T * 100$$

where, DWG= daily weight gain (g fish day⁻¹); B_t = Brazilian flounder biomass at day 45 (g); B_0 = Brazilian flounder biomass at the beginning of the experiment (g); T = sampling time (days).

$$\text{FCR} = \text{TFS} (\text{FB} - \text{IB})$$

where, FCR= feed conversation ratio; TFS = total feed supply (g); FB = final stock biomass; IB = initial stock biomass.

$$\text{PCA} = (\text{TSA} * N * 100) / A$$

where, PCA= percentage of covered area (%); TSA= total surface area (cm²); N = number of fish; A = culture is available (cm²).

$$SGR = ((\ln(W2) - \ln(W1)) / T) * 100$$

where, SGR= specific growth rate (% day⁻¹); W1 and W2 = initial and final weights (g); T = sampling time (days).

$$Cv_{BW} = 100 * (SD / BW)$$

where, Cv_{BW} = coefficient of variability of body weight; SD = standard deviation of the average body weight; BW = body weight (g)

$$K = (Wt/L^3) * 100$$

where, K = condition factor (g cm⁻³); Wt = wet weight (g) at sampling day; L = total length (cm).

2.3. Measurement of biochemical variables

2.3.1. Tissue samples preparation

To perform the biochemical parameters, 12 individuals of each tank were randomly removed at the end of the experiment, and were immediately euthanized with a lethal dose of hydrochloride benzocaine (500 ppm) and samples of gills, liver, brain, and muscle were collected, frozen in liquid nitrogen, and stored in ultrafreezer (-80 °C) for further analysis. Samples of gill, liver, brain and muscle tissues were homogenized (1:5; w/v) in a Tris-HCl (100 mM, pH 7.75) buffer with EDTA (2 mM) and MgCl₂.6H₂O (5 mM) (da Rocha et al. 2009). The supernatants resulting from the centrifugation of the homogenates (20000 x g, 20 minutes, 4°C) were used for analyses. Quantification of total protein was performed by the Biuret method ($\lambda = 550$ nm) in triplicate using a microplate reader (Biotek Synergy HT) as performed in previous studies (Amado et al., 2009). Mean protein concentration (± 1 standard error) of tissues was respectively: gills (14.03 ± 0.35 mg/mL),

liver (27.67 ± 1.00 mg/mL) and brain (4.82 ± 0.16 mg/mL) and muscle (18.06 ± 0.51 mg/mL).

2.3.2. Measurement of total antioxidant capacity (ACAP)

ACAP was detected according to the method described by Amado et al. (2009). It is based on the detection of reactive oxygen species (ROS) in samples with presence or absence of 2,2-azobis 2 methylpropionamidinedihydrochloride (ABAP, 4 mM), which at 37 °C generates peroxy radicals. All samples were fixed to 2.0 mg protein mL⁻¹. For determination of ROS 2',7' dichlorofluorescein diacetate - H2DCF-DA was used at a final concentration of 40 mM. Readings were taken in a fluorescence microplate reader Biotek Synergy HT (excitation: 485 nm; emission: 520 nm) with readings at every 5 minutes, during 35 minutes. The results were expressed as a relative area (the difference between the ROS area with and without ABAP relative to the without ABAP). For interpretation purposes of the results, a higher relative area means a lower antioxidant capacity and vice-versa (Monserrat et al. 2014).

2.3.3. Measurement of intracellular reduced glutathione (GSH)

It was performed by the method of White et al. (2003) and Chen et al. (2008) with modifications. The protocol is based it measures the concentration of GSH by its reaction with DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)). For the assay, 100 µL of supernatant, 200 µL of reaction solution (Tris-base 0.4M, pH = 8.9) and 10 µL of DTNB were then transferred to microplate and they were incubated for 15 minutes at ambient temperature. The readings were made in spectrofluorimeter with plate reader (Biotek Synergy HT). The concentration was expressed in µmoles of GSH per mg of protein.

2,3,4. Measurement glutathione- S - transferase (GST) activity

GST activity was determined following the method of Habig and Jakob (1981). In this process, the absorbance is generated by conjugating 1 mM GSH (reduced glutathione, Sigma-Aldrich) with 1 mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, Sigma-Aldrich), at 340 nm absorbance at 25 °C. To read, 15 µL of the supernatant was added to the microplate in a flat bottom, in 235 µL of reaction medium (KH_2PO_4 – 0.05 M; K_2HPO_4 – 0.05 M; pH = 7.0), added 10 µL of 25 mM GSH. The readings were in spectrofluorimeter with a plate reader (Biotek Synergy HT). The specific activity of GST was expressed in nanomoles of CDNB-GSH product per minute per mg of protein.

2.3.5 Measurement of protein sulfhydryl groups (P-SH) concentration

It was performed by the method of Chen et al. (2008) in which it measures P - SH group concentration by its reaction with DTNB (5,5'-Dithiobis (2 - nitrobenzoic acid)). For the assay, 240 µL of sample and 28 µL of trichloroacetic acid (TCA, 50%) were added to eppendorf tubes so were centrifuged at 14000 rpm at 4 °C for 15 minutes. the GSH precipitate was used and resuspended using 200 µL of homogenization buffer for subsequent homogenization. Finally, 100 µL of supernatant, 160 µL of reaction solution (Tris-base 0.2 M, pH = 8.2) and 10 µL of DTNB were transferred to clear microplate and they were incubated for 15 minutes. The readings were made in spectrofluorimeter with plate reader (Biotek Synergy HT), at room temperature. The concentration was expressed in µmololes of P-SH per mg of protein.

2.3.6. Lipid Peroxidation – thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

The lipid peroxidation levels were measured according to Oakes and Van Der Kraak (2003). To determine the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by the

quantification of malondialdehyde (MDA). Samples (gills: 40 µL; liver: 80 µL; brain: 50 µL and muscle: 100 µL) were added to a reaction solution containing 20 µL of BHT solution (67 µM), 150 µL 20% acetic acid solution, 150 µL 0.8 % TBA solution, 50 µL distilled water, and 20 µL of 8.1% SDS. The samples were incubated at 95 °C for 30 min. Thereafter, 100 µL of distilled water and 500 µL of n-butanol were added to the final solution. The remaining supernatant after centrifugation (3000 x g, 10 minutes, 15 °C) was used to determine the fluorescence (excitation: 520 nm; emission: 580 nm) and the results were expressed as nmol MDA mg wet tissue-1.

3. Statistical analysis

For growth parameters and oxidative stress, a data was expressed as mean ± standard error (SEM). All data were analysed for normality (Kolmogorov-Smirnov) and homoscedasticity of variance (Levene's test) and, when necessary, these requisites were achieved by logarithmic transformation. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) and when significant differences were obtained from the ANOVA, multiple comparisons were carried out performing Tukey mean comparison test. The level of significance used was $P \leq 0.05$ for all statistical tests. All statistical analysis was performed using the computer package STATISTIC 7 and the figures were made using GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

4. Results

4.1. Water quality

Dissolved oxygen saturation was significantly lower at 200% PCA than in 50% PCA, 72.6 ± 12.3 and 87.9 ± 13.1 % respectively ($p < 0.05$). Temperature (25.0 ± 3.7 °C), salinity (27 ± 4 ‰), alkalinity (3.35 ± 0.02 meq/L) and pH (7.38 ± 1.10) were maintained

within the target range and were similar among treatments. The average total ammonia nitrogen (TAN) concentration increased with increasing stocking density from 50% PCA (0.270 mg N-NH₄+NH₃/L) until 200% PCA (0.369 mg/L), nitrite concentration varied between 0.348 to 2.744 mg N-NO₂/L.

4.2. Survival and growth performance

The biometric and survival data are shown in Table 1. Differences for W, TL, TSA were detected among the treatments and it was reflected at the end of the experiment where the largest fish were those stocked originally at 50 - 100% PCA, and the smallest those stocked at 150 - 200% PCA.; as well as for DWG and SGR, which showed an inverse linear relationship with stocking density. The increase in fish biomass per area (BFA) at day 45 was 424%, 408%, 324% and 287% for the 50% PCA, 100% PCA, 150% PCA and 200% PCA, respectively. Stocking density had no significant effect on survival.

The feeding rate influenced the intra-group coefficient of variability of body weight (Cv_{BW}). The quotient of the final and initial values of the Cv_{BW} coefficients (Cv_{BWf}/Cv_{BWi}) was in the range of 0.734 (100%) to 1.213 (50%), while the difference between the groups was statistically differences ($p<0.05$; Table 1).

TABLE 1 Growth performance of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* juveniles reared at different stocking densities for 45 days

Parameters	Stocking Density (PCA)			
	50%	100%	150%	200%
Weight (g)				
Initial		1.580 ± 0.204		
Final	8.358 ± 1.526 ^a	8.135 ± 1.485 ^a	6.701 ± 1.223 ^b	6.133 ± 1.120 ^b
TL (cm)				

Initial		5.353 ± 0.691		
Final	9.384 ± 1.713 ^a	9.446 ± 1.725 ^a	8.798 ± 1.606 ^b	8.453 ± 1.543 ^c
TSA (cm ² / fish)				
Initial		7.734 ± 0.998		
Final	24.945 ± 4.554 ^a	24.018 ± 4.385 ^a	21.017 ± 3.837 ^b	19.155 ± 3.497 ^b
PCA (%)				
Initial	50.467	100.934	151.402	201.869
Final	162.775	313.451	411.429	499.919
Increment (%)	222.537	210.550	171.746	147.645
BFA (Kg/m ²)				
Initial	1.031	2.061	3.092	4.123
Final	5.402	10.430	13.117	15.974
Increment (%)	423.957	407.521	324.224	287.436
DWG (g fish day ⁻¹)	1.798 ± 0.301 ^a	1.783 ± 0.299 ^a	1.698 ± 0.295 ^b	1.650 ± 0.308 ^b
FCR	0.757 ± 0.142 ^{ab}	0.729 ± 0.145 ^b	0.824 ± 0.139 ^{ab}	0.763 ± 0.132 ^{ab}
SGR (% day ⁻¹)	3.681 ± 0.551 ^a	3.603 ± 0.541 ^a	3.211 ± 0.529 ^b	3.015 ± 0.579 ^b
K (g cm ⁻³)	1.010 ± 0.185 ^a	0.961 ± 0.182 ^b	0.984 ± 0.182 ^{ab}	1.016 ± 0.191 ^a
Cv _{BW} (%)	1.213 ^a	0.734 ^b	0.926 ^{ab}	1.186 ^a
S (%)	99.771	100.000	100.000	100.000

Note: Values are means ± SEM (n=4). TL (total length), TSA (total surface area), PCA (percentage of covered area), BFA (biomass of fish per area), DWG (daily weight gain), FCR (feed conversion ratio), SGR (specific growth rate), K (condition factor), Cv_{BW} (coefficient of variability of body weight) and S (survival index). Values with different superscripts letters next to value indicate significant differences among groups (p < 0.05).

4.1. Biochemical parameter assays

4.1.1. Total antioxidant capacity – ACAP

A significant increase (p<0.05) was observed in total antioxidant capacity (lower relative area) in gills of fish stocked at 50, 100 and 150 % PCA compared to those stocked at 200 % PCA during of 45 days of the experiment. (Figure 1a). In relation to the brain and liver, were observed that fish stocked at 150 % PCA showed no significant differences between

treatments (Figure 1b, c). Nevertheless, for muscle no showed significant differences ($p>0.05$) between treatments over time (Figure 1d).

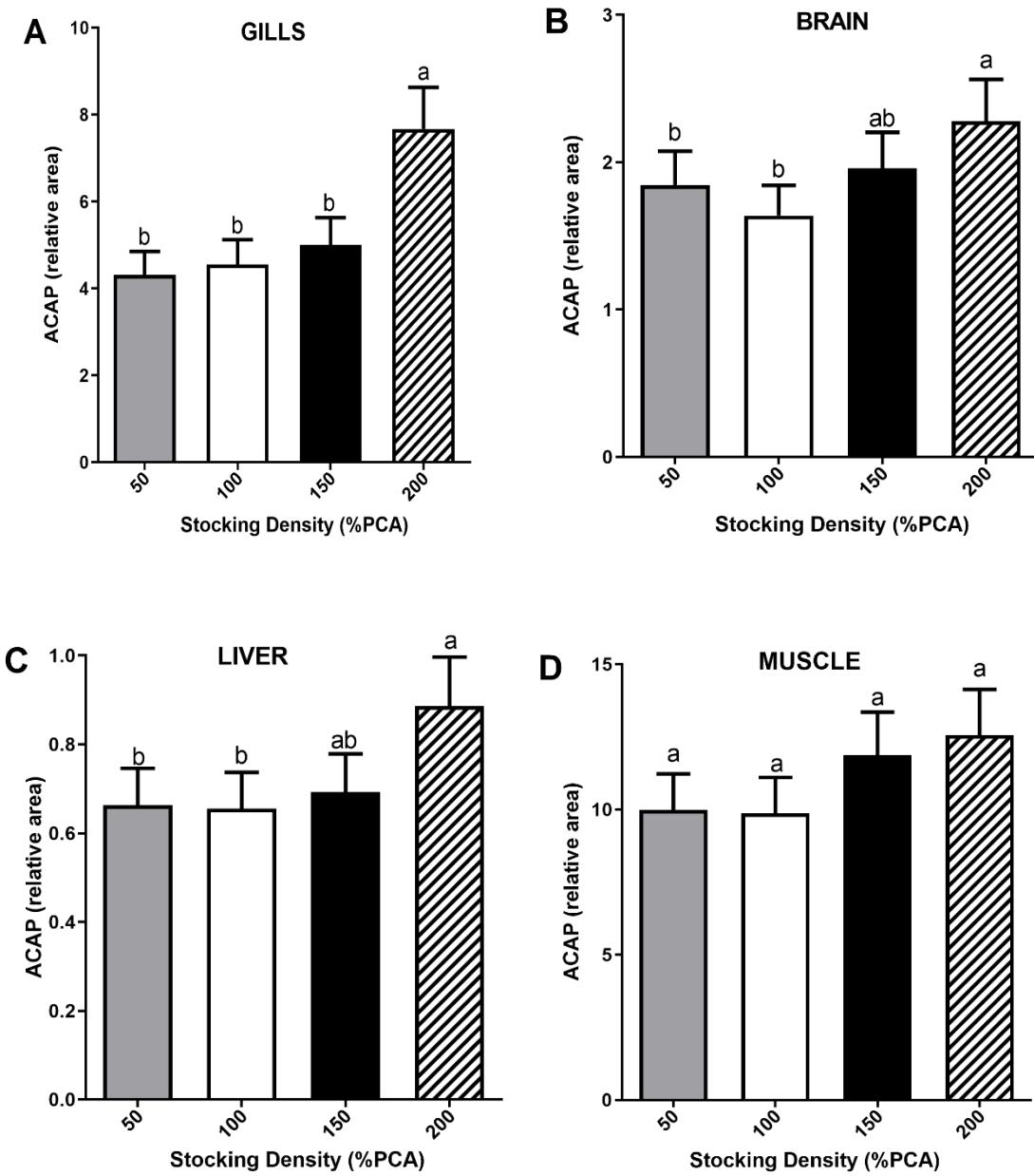
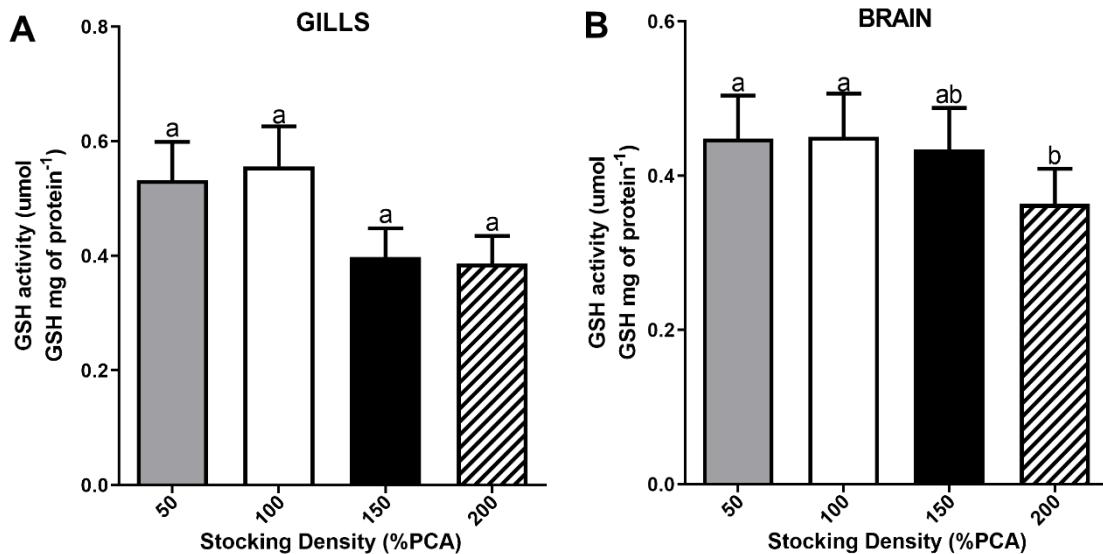


FIGURE 1 Total antioxidant capacity (ACAP) of gills (a), brain (b), liver (c) and muscle (d) in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* reared at different stocking densities expressed in percentage of covered area (%PCA). Values are expressed as

means \pm SEM ($n = 16$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

4.1.2. Reduced glutathione - GSH

The GSH content in gills was lower in 150 and 200%PCA compared to 50 and 100% PCA (Fig. 2a). Brain and liver GSH content showed a higher value in fish held at 50, 100 and also 150% PCA (Fig. 2b, c). Finally; in muscle, reduced GSH content was observed at 150 and 200%PCA in relation to 50 and 100% PCA (Fig. 2d).



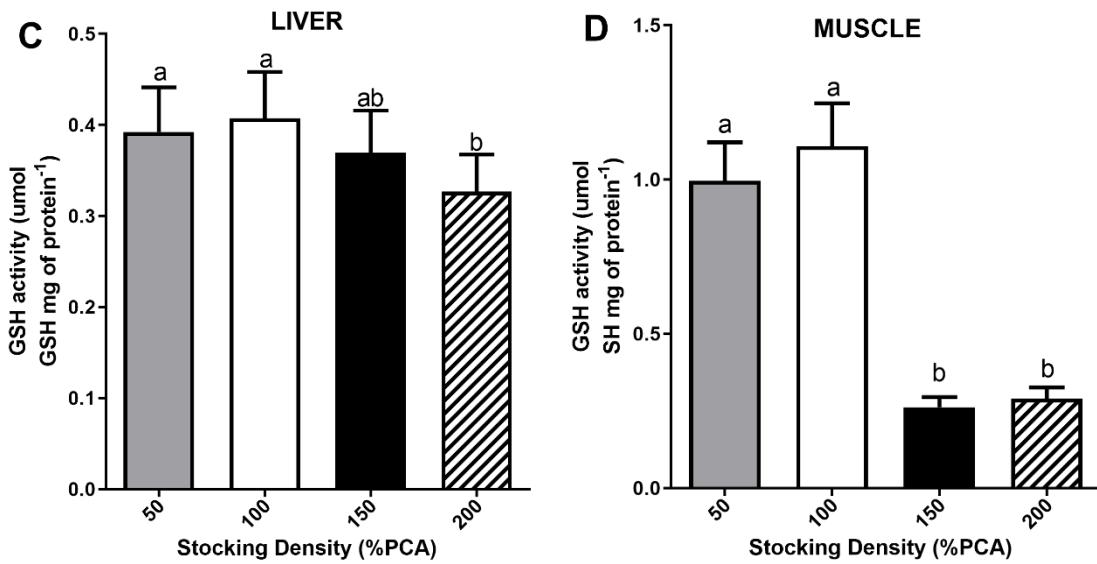


FIGURE 2 Determination of GSH activity of gills (a), brain (b), liver (c) and muscle (d) in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* reared at different stocking densities expressed in percentage of covered area (%PCA). Values are expressed as means \pm SEM ($n = 16$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

4.1.3. Glutathion S - Transferase – GST

The GST activity in gills was lower at 50% PCA compared with 100, 150 and 200% PCA (Fig. 3a). Brain of fish held at 150 and 200% PCA showed enhanced GST activity compared with 50 and 100% PCA (Fig. 3b). GST activity in liver increased in fish held at 200% PCA compared to the other treatments (Fig. 3c). Finally, no differences were found among treatments in muscle GST activity (Fig. 3d).

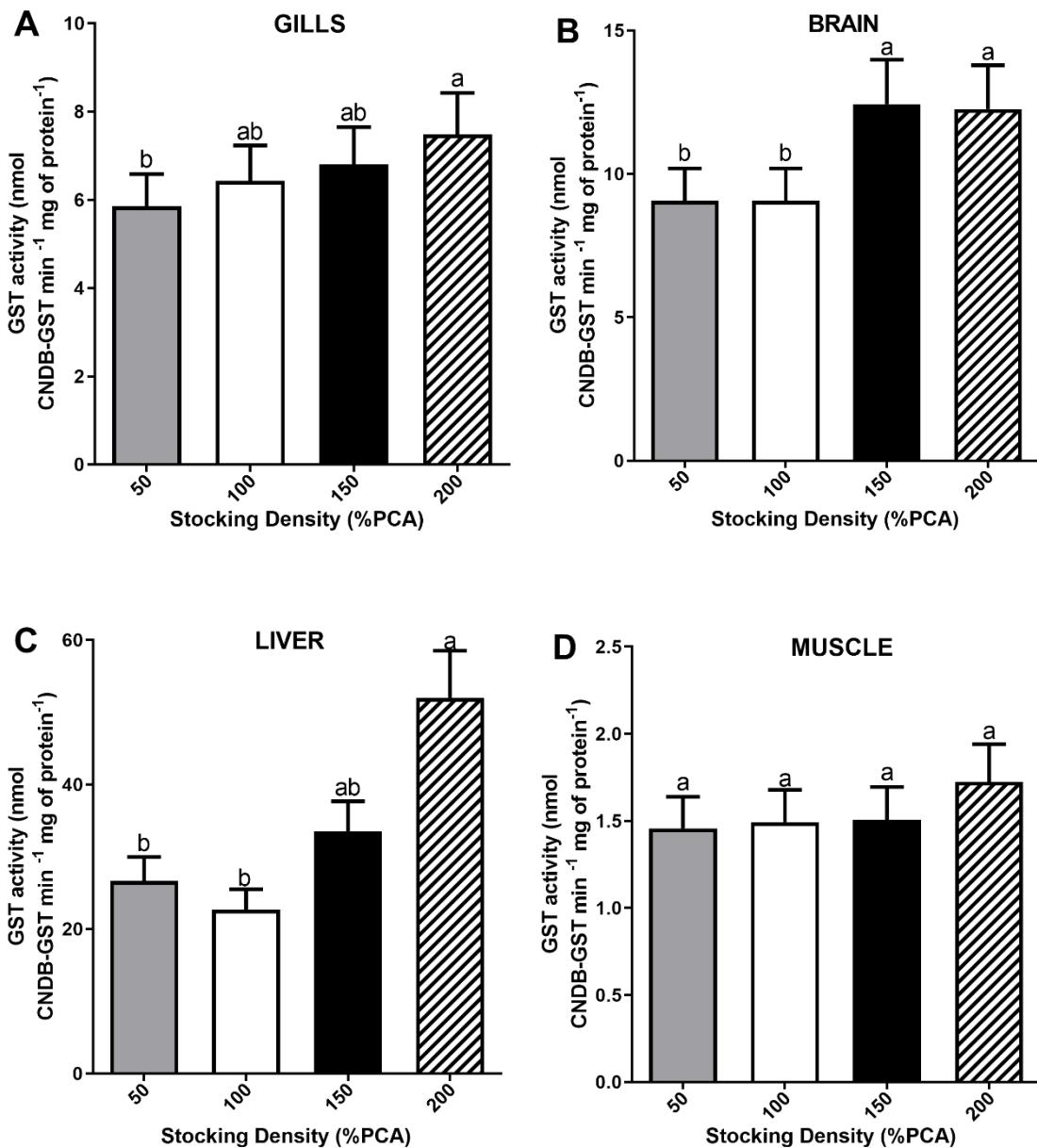


FIGURE 3 Determination of Glutathione-S-transferase (GST) activity of gills (a), brain (b), liver (c) and muscle (d) in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* reared at different stocking densities expressed in percentage of covered area (%PCA). Values are expressed as means \pm SEM ($n = 16$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

4.1.4. Content of Protein thiols – PSH

The PSH content was higher in the liver of fish held at 200% PCA in relation to 150, 100 and 50% PCA (Fig. 4c). PSH content was higher in gills, brain and muscle of fish held at 200% PCA but in those organs is observed that from 150% PCA are signs of stress (Fig. 4a, b, d).

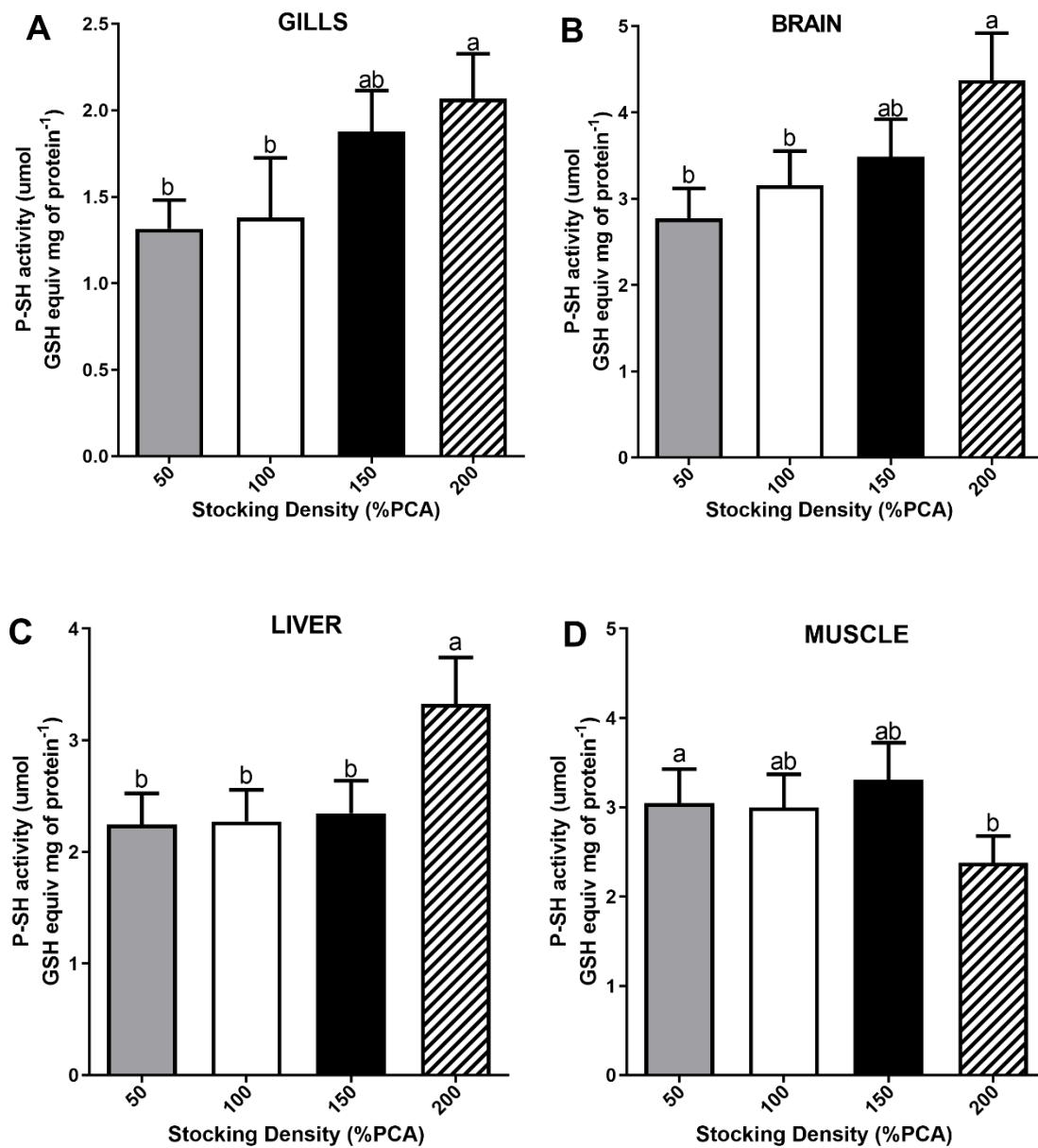
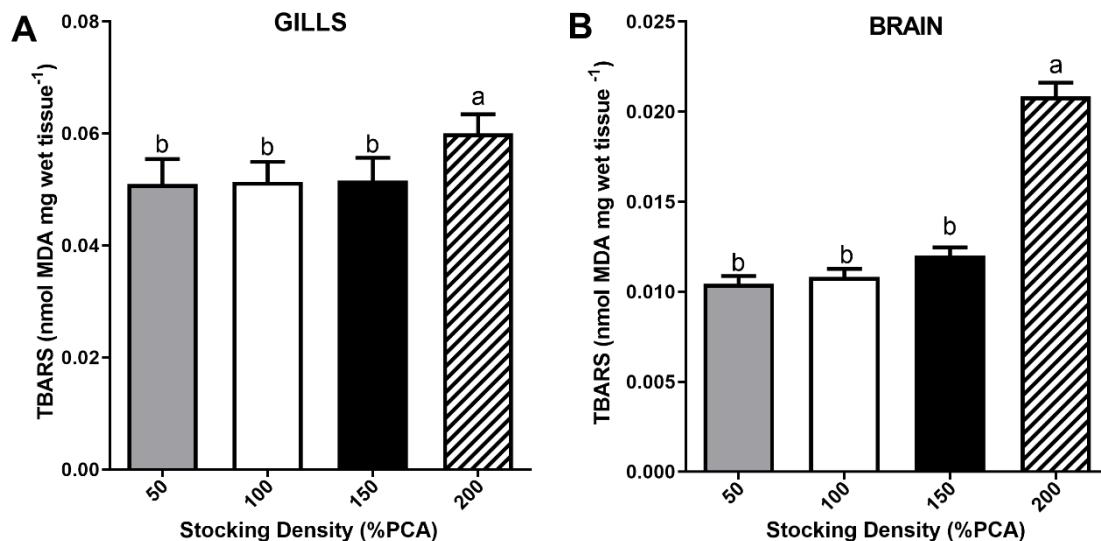


FIGURE 4 Determination of content of Sulfhydryl groups associated with Protein (P-SH) of gills (a), brain (b), liver (c) and muscle (d) in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* reared at different stocking densities expressed in percentage of covered area (%PCA). Values are expressed as means \pm SEM ($n = 16$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

4.1.5. Lipid peroxidation – TBARS

During the course of the experiment, a significant reduction ($p < 0.05$) in lipid peroxidation levels of gills, brain and muscle were verified at 50, 100 and 150% PCA compared to fish stocked at 200% PCA (Figure 5a, b, d). Nevertheless, no differences ($p > 0.05$) were observed in muscle LPO level among different treatments (Figure 5c).



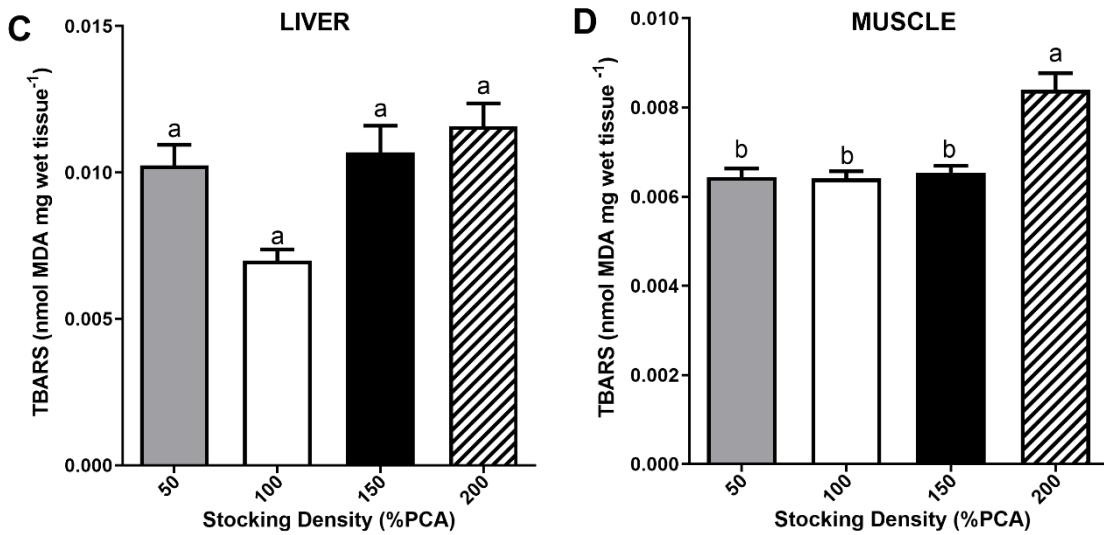


FIGURE 5 Levels of lipid peroxidation (TBARS) of gills (a), brain (b), liver (c) and muscle (d) in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* reared at different stocking densities expressed in percentage of covered area (%PCA). Values are expressed as means \pm SEM ($n = 16$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

5. Discussion

The present study, emphasizes that fish stocking density has a significant effect on the growth performance and the physiological responses. The importance of evaluating density stress is towards determining optimal conditions concerning welfare of farmed fish for a better planning an experimental design. The assessment of stress determined by the biochemical analysis approaches can thus be used to establish more comprehensive evaluation of density stress providing a higher level of confidence in subsequent experimental data.

The water quality parameters were maintained within the safe levels recommended for the Brazilian flounder. With respect to the effect of dissolved oxygen in the physiology

on flatfish, there is an extensive literature. Tallqvist et al. 1999 describes that for juveniles of *Platichthys flesus*, the critical oxygen saturation that causes the decrease in feeding efficiency was 30%, while Vander Thillar et al. 1994 recorded a decrease in activity at an oxygen saturation of 40%. In the present study, the concentration of dissolved oxygen was always above 70% saturation from 87.996 % of oxygen saturation (50% PCA) to 72.127 % of oxygen saturation (200% PCA); this drop-in oxygen resulted from a combined effect of high stocking densities (200 % and 150%) and the increasing amount of feed offered.

The other parameters were within the tolerance ranges described for *P. orbignyanus*, which has the capacity to tolerate wide temperature range (Wasielesky et al. 1998), salinity (Sampaio and Bianchini 2002) and pH level was between 7.283 to 7.494, which is a safe recommended level for the specie (Wasielesky et al. 1997).

In the case of TAN, the worst condition measured was for 200 % PCA with 0.369 mg TAN/L which is equivalent to 0.003 mg NH₃ – N/L. Maltez et al. 2017 reported that 0.12 mg NH₃ – N/L induces oxidative stress and antioxidant responses in juvenile Brazilian flounder. Merino et al. (2007) reported for *Paralichthys californicus* that growth was not affected when fish were exposed up to 0.05 mg NH₃ – N/L. Therefore the highest concentration of un-ionized ammonia recorded in the present study is within a safe range. For nitrite, reports about the effect on Brazilian flounder includes the study of Maltez et al. 2018, where concentrations between 5.72 and 15.27 mg NO₂/L compromised the overall antioxidant system and induced oxidative stress. Therefore the worst concentration of nitrite recorded in the present study is within a safe range.

Survival of Brazilian flounder was not affected within the range of stocking densities tested in the present experiment. Although there are studies that report an inverse correlation between survival and density (Yang and Lin 2001, Hitzfelder et al. 2006, Rowland et al. 2006), there are also others in which they do not report any significant effect of density on survival (Webb et al. 2007, Salas Leiton et al. 2010, Laiz-Carrión et al. 2012, Riche et al. 2013).

Growth performance was negatively influenced when the density was above a certain value. Similar results also were obtained in previous studies with different fish species (Wang et al. 2018, Guo et al. 2017, McKenzie et al. 2012, Castillo Vargas et al. 2012, Sanchez et al. 2011). However, some studies in others flatfish showed no significant effect of SGR by this variable (Andrade et al. 2015, Salas Leiton et al. 2008, Aijun et al. 2006, Fairchild and Howell 2001); and also, no significant effect of stocking density were found on growth parameters for *Scophthalmus maximus* (Martínez-Tapia and Fernandez-Pato 1991), *Paralichthys dentatus* (King et al. 1998) or *Pseudopleuronectes americanus* (Fairchild and Howell 2001). On the other hand, studies carried out in *Paralichthys californicus* (Merino et al. 2007), *Hippoglossus hippoglossus* (Kristiansen et al. 2004), *Scophthalmus maximus* (Liu et al. 2017, Liu et al. 2016, Andrade et al. 2015, Irwin et al. 1999) and *Scophthalmus rhombus* (Herrera et al. 2012) showed negative effects on growth performance when the stocking density was increased.

Guo et al. 2017 also reported that some social interactions (hierarchic structures) increase with increasing stocking densities. Also, an indicator of establishment of hierarchies in fish is the increase in CV (Irwin et al. 1999, North et al. 2006, Lambert and Dutil 2001). In this study, the CV increased significantly from 100% to 200% PCA. The results

showed an intraspecific competition for food and space (Duan et al. 2011, Liu et al. 2016) and were similar to found by Jia et al. 2016 and Li et al. 2013 for turbot juveniles. Therefore, behavioural studies of the mechanisms of social interaction causing reduced growth with an increase in stocking may be required for future research.

The Fulton condition factor (K) is an indicator of the general welfare of the fish. The Brazilian flounder in the present study had a K value between 0.984 and 1.016; values close to those found for the California halibut (Merino et al. 2007), and which, according to Fulton's definition of condition, will be considered as healthy fish.

Fish, like other aerobic organisms, have a complex antioxidant system with several enzymatic and non-enzymatic defenses to protect tissues against oxidative damage (Halliwell and Gutteridge 2015). The total antioxidant capacity (ACAP) evaluation provides the general antioxidant status of fish, without distinguishing between enzymatic and non-enzymatic components. The ACAP in tissues of the Brazilian flounder was compromised in gills, brain and liver at a density of 200% PCA compared with the other 3 treatments (Fig 1a, b, c), indicating that there is a variability in the antioxidant competition between the different organs (Maltez et al. 2017). Caipang et al. 2008, 2009 reported that stress of overcrowding decreased the level of antioxidant capacity and consequently the level of enzymes involved in the antioxidant defense. Furthermore, Yarahmadi et al. 2016 showed a decrease in total seric antioxidant capacity in trout raised at a density of 80 kg/m³ after 30 days compared to densities of 10 and 40 kg/m³. Finally, this decrease in ACAP in the treatment of 200% PCA in those organs have been indicated that, there is a suppression of oxidative defense, probably due to the damage of the oxidative defense system after exposure to a overcrowding situation (Braun et al. 2010);

as well as, to the use of enzymes related to oxidative stress to eliminate of the reactive oxygen species (ROS) produced in cells and tissues due to the situation of oxidative stress (Nagae et al. 1994, Caipang et al. 2009).

GSH is the most abundant intracellular non-protein thiol and in function of their antioxidant properties, it is able to protect cells from ROS formed during normal mitochondrial respiration and metabolism of foreign chemical (Hammond et al. 2004). The results obtained in the present study showed an decrease in all analyzed organs between the stocking density and GSH activity may be due to increased consumption of GSH via GST or it may have directly reacted with ROS, in turn leading to attenuate the deleterious effects of the active oxygen species that were not metabolized by the enzymatic system of antioxidant defenses, defined here as the imbalance between lipid peroxidation and antioxidant defenses (Droge 2002). The results obtained in the present study allow to suggest that glutathione can constitute a good metabolic indicator of oxidative stress in Brazilian flounder.

In this study, Brazilian flounder juveniles held at 200% PCA showed the highest concentration of P-SH level in all analyzed organs and it could be result either from enhanced thiols synthesis, decrease consumption and/or degradation (Husak et al., 2017). Furthermore, GSH can covalently modify cysteine residues of protein thiols in a reversible process called S-glutathionylation, avoiding irreversible oxidative damage (Jakob and Reichmann 2013). Finally, this increment in PSH content, it has been indicating a reduced oxidative damage in proteins, similar result was obtained for Maltez et al. 2018.

GST is an important enzyme for the biotransformation of xenobiotics and degradation of endogenous compounds (Blanchette et al 2007), it is involved in the oxidative stress pathway and catalyzes conjugation GSH with nucleophile xenobiotics or ROS-impaired nuclear component (O'Brien et al. 2000) and is a useful biochemical biomarker of environmental stress (Carvalho Neta and Abreu Silva 2013). In the present work, fish held at 200% PCA showed highest levels of GST activity in the gills, brain, liver and muscle, implying that high stocking density conditions might response to the production of reactive oxygen species in Brazilian flounder because were an increase of the activity of antioxidant enzymes GST in order to combat peroxides, less harmful free radicals (Sayeed et al 2003); and, it was support for other reports where they confirmed that high stocking density could induce oxidative stress (Liu et al 2017, Jia et al 2016, 2017).

Lipid peroxidation is considered a valuable biomarker of oxidative damage of cellular constituents (Morales et al. 2004, Pérez-Jiménez et al. 2012). In the present study, lipid peroxidation increased with increasing stocking densities in all the evaluated organs, suggesting that higher stocking density results in increased peroxidation and cell degradation in Brazilian flounder. Among the organs analyzed, the gills presented higher basal levels of TBARS and lower thiol group content, indicating a preexisting and more intense prooxidant environment, making it more susceptible to oxidative damage during a stress event. This result may indicate more serious effects, possibly related to a decrease in polyunsaturated fatty acid levels due to early oxidative degradation (Sun et al. 2014b), and it could explain the reason for the reduced levels of TBARS in the liver of fish held at 150 and 200% PCA. However, reduced hepatic TBARS could also be related to a greater detoxification of the LPO end products such as MDA, due to the concurrent increase in GST activity. The responses to oxidative stress can be influenced by the

metabolism and the basal redox condition of each organ (da Rocha et al., 2009). Finally, previous studies showed that density increased lipid peroxidation and altered antioxidant enzyme activity in the serum and tissue (Liu et al. 2017, Sahin et al 2014, Braun et al. 2010, Kucukbay et al. 2009, Trenzado et al. 2008); but, in the other hand, Wang et al. 2013, reported that of TBARS level content of African catfish was unaffected by stocking density.

6. Conclusion

This study showed that Brazilian flounder juvenile can be reared in 100 % PCA without showing any sign of stress. Likewise, when the stocking density reached up to 150% PCA, the growth performance and the physiological response were adversely affected with a tendency to increase free radical production that could damage the antioxidant defense system. Perturbations of ROS – related processes in response to Brazilian flounder juvenile to stocking density were most pronounced in brain among the four tissues analyzed. The obtained results call for open new avenues for future investigations.

7. Acknowledgements

This study was supported by research funds from Brazilian CNPq and CAPES. The authors are grateful to CNPq for research fellowships provided to L.A. Sampaio, and to CAPES for a MSc scholarship provided for Joel F. Linares.

8. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

9. References

Aijun, M., Chao, Ch., Jilin, L., Siqing, Ch., Zhimeng, Z., Yingeng, W., 2006. Turbot *Scophthalmus maximus*: stocking density on growth, pigmentation and feed conversion. Chin. J. Oceanol. Limnol. 24(3), 307–312. <https://doi.org/10.1007/PL00020777>

Amado, L.L., Longaray Garcia, M., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ribas Ferreira, J.L., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. Sci Total Environ 407,2115–2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>

Andrade, T., Afonso, A., Pérez-Jiménez, A., Oliva-Teles, A., de las Heras, V., Mancera, J.M., Serradeiro, R., Costas, B., 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral imune parameters and oxidative status. Aquaculture 438, 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.034>

Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. JMar Res 11:87–96

Bianchini, A., Wasielesky, W., Filho, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull Environ Contam Toxicol 56,453–459. <https://doi.org/10.1007/s001289900065>

Biswas, G., Ghoshal, T.K., Natarajan, M., Thirunavukkarasu, A.R., Sundaray, J.K., Kailasam, M., De, D., Sukumaran, K., Kumar, P., Ponniah, A.G., 2013. Effects of stocking density and presence or absence of soil base on growth, weight variation, survival and body composition of pearlspot, *Etroplus suratensis* (Bloch) fingerlings. Aquaculture Research 44, 1266–1276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03132.x>

Björnsson, B., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Ólafsdóttir, S.R., 2012. Optimal stocking density of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared in a land-based farm. Aquaculture 356, 342 – 350. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.047>

Blanchette, B., Feng, X., Singh, B.R., 2007. Marine glutathione S-transferases. Mar. Biotechnol. 9, 513-542. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9034-0>

Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y., Tanaka, M., 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 259, 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.021>

Bolasina, S.N., 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. Aquaculture 313, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.011>

Braun, N., de Lima, R.L., Baldisserotto, B., Dafre, A.L., de Oliveira Nuñer, A.P., 2010. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. Aquaculture 301, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.022>

Caipang, C.M.A., Brinchmann, M.F., Berg, I., Iversen, M., Eliassen, R., Kiron, V., 2008. Changes in selected stress and immune-related genes in Atlantic cod, *Gadus morhua*, following overcrowding. Aquacult Res. 39,1533–1540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02026.x>

Caipang, C.M.A., Berg, I., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2009. Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. Aquaculture. 295,110–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.036>

Carvalho-Neta, R.N., Abreu-Silva, A.L., 2013. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Scia des herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. Lat Am J Aquat Res 41, 217-225.

<https://doi.org/10.3856/vol41-issue2-fulltext-2>

Castillo-Vargas, S., Ponce, J., Garcia, M., Arredondo, J.L., Ruiz, A., Chavez, E., Tacon, A., 2012. Effect of stocking density on growth performance and yield of subadult Pacific red snapper cultured in floating sea cages. North American Journal of Aquaculture 74, 413 – 418. <https://doi.org/10.1080/15222055.2012.676002>

Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A., 2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). Comp Biochem Physiol A 163, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.003>

Chen, W., Zhao, Y., Seefeldt, T., Guan, X., 2008. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *J Pharm Biomed Anal* 48 (5), 1375–1380. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.08.033>

Da Rocha, A.M., de Freitas, D.S., Burns, M., Vieira, J.P., de La Torre, F.R., Monserrat, J.M., 2009. Seasonal and organ variations in antioxidant capacity, detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from Southern Brazil. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150,512–520. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.07.012>

Dou, S., Masuda, R., Tanaka, M., Tsukamoto, K., 2004. Size hierarchies affecting the social interactions and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 233, 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.054>

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82 (1),47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

Duan, Y., Dong, X., Zhang, X., Miao, Z., 2011. Effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on the growth, energy budget and body composition of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult. Res.* 42, 407–416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02635.x>

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st edn. American Public Health Association, Washington, D.C.

Fairchild, E., Howell, W., 2001. Optimal stocking density for juvenile winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. Journal of the World Aquaculture Society 32, 300–308. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00453.x>

Guo, H.Y., Dong, X.Y., Zhang, X.M., Zhang, P.D., Li, W.T., 2017. Survival, growth and physiological responses of juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schelegel, 1846) exposed to different dissolved oxygen concentrations and stocking densities. J. Appl. Ichthyol. 33 (4), 1-9. <https://doi.org/10.1111/jai.13369>

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. Oxford University Press, USA

Hammond. C.L., Madejczyk, M.S., Ballatori, N., 2004. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 195: 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.008>

Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Hachero, I., Vargas-Chacoff, L., Amo A., Mancera, J.M., 2012. Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill *Scophthalmus rhombus*. Aquacult Int 20,1041–1052. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9513-9>

Hitzfelder, G.M., Holt, G.J., Fox, J.M., McKee, D.A., 2006. The effect of rearing density on growth and survival of cobia, *Rachycentron canadum*, larvae in a closed recirculating

aquaculture system. J World Aquacult Soc 37(2), 204-209.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00028.x>

Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V. I., 2017. Acute exposure to the penconazole-containing fungicide Topas partially augments antioxidant potential in goldfish tissues. Comp. Biochem. Phys. C 193, 1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.12.003>

Ibarz, A., Martin-Perez, M., Blasco, J., Bellido, D., de Oliveira, E., Fernandez-Borras, J., 2010. Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. Proteomics 10, 963–975. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900528>

Irwin, S., O' Haalloran, J., Fitzgerald, R.D., 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). Aquaculture 178,77 – 88. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00122-2)

Jakob, U., Reichmann, D., 2013. Oxidative stress and redox regulation. Springer, Dordrecht

Jia, R., Liu, B., Feng, W.R., Han C., Huang, B., Lei, J.L., 2016. Stress and imune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. Fish shellfish Immunol 55,131-139 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.032>

King, N., Howell, W.H., Fairchild, E., 1998. The effect of stocking density on the growth of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*. In: Howell W.H., Keller B.J., Park P.K., McVey J.P., Takayanagi K., Uekita Y. (Eds.), U.S. – Japan Aquaculture

Symposium, Durham, New Hampshire (USA), 16 – 18 Sep 1997, Nutrition and Technical Development of Aquaculture 26, 173 – 180.

Kristiansen, T.S., Fernö, A., Holm, J.C., Privitera, L., Bakke, S., Fosseidengen, J.E., 2004. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. Aquaculture, 230, 137-151. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00436-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00436-8)

Küçükbay, F.Z., Yazlak, H., Karaca, I., Sahin, N., Tuzcu, M., Cakmak, M.N., Sahin, K., 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. Aquaculture Nutrition 15 (6), 569-576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00624.x>

Labatut, R., Olivares, J., 2004. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles using shallow raceways tanks and recirculation. Aquacultural Engineering 32, 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.05.008>

Laiz-Carrión, R., Viana, I.R., Cejas, J.R., Ruiz-Jarabo, I., Jerez, S., Martos, J.A., Berro, A., Mancera, J.M., 2012. Influence of food deprivation and high stocking density on energetic metabolism and stress response in red porgy, *Pagrus pagrus* L. Aquacult Int 20(3), 585-599. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9488-y>

Lambert, Y., Dutil, J.D., 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus moruhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and sizegrading. Aquaculture 192, 133-147. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00448-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00448-8)

Li, X., Liu, Y., Blancheton, J.P., 2013. Effect of stocking density on performances of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) in recirculating aquaculture systems. Chinese J. Oceanol. Limnol. 31(3), 514 – 522. <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-013-2205-0>

Liu, B., Jia, R., Han, C., Huang, B., Lei, JL., 2016. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 190, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.07.007>

Liu, B., Jia, R., Zhao, K., Wang, G., Lei, JL., Huang B., 2017. Stocking density on growth and stress response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in land-based recirculating aquaculture system. Acta Oceanol Sin 36 (10),31-38.

<https://doi.org/10.1007/s13131-017-0976-4>

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*. Fish Physiol Biochem 43(6), 1747–1759. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0406-8>

Maltez, L.C., Barbas, L.A., Nitz, L.F., Pellegrin, L., Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., Monserrat, J.M., Garcia, L., 2018. Oxidative stress and antioxidant responses in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* exposed to sublethal levels of nitrite. Fish Physiol Biochem 44(5), 1349–1362. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0526-9>

McKenzie, D. J., Höglund, E., Dupont-Prinet, A., Larsen, B. K., Skov, P.V, Pedersen, P. B., Jokumsen, A. 2012. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. Aquaculture, 338–341, 216–222.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.020>

Merino, G., Piedrahita, R., Conklin, D., 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. Aquaculture 265, 176 – 186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.028>

Millner, R., Walsh, S.J., Diaz de Astarloa, J.M., 2005. Atlantic flatfish fisheries. In: Gibson, R. N., Nash, R. D. M., Geffen, A. J., Van Der Veer, H. W. (Eds.), Flatfishes: Biology and Exploitation. Blackwell Science Ltd, Oxford, 240-271.

Monserrat, J.M., Garcia, M.L., Ventura-Lima, J., Gonzalez, M., Ballesteros, M.L., Miglioranza, K.S., Ame, M.V., Wunderlin, D.A., 2014. Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia multidentata* (Anablapidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. Pestic Biochem Physiol 108,8–15.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.10.009>

Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comp. Biochem. Physiol. 139, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>

Nagae, M., Fuda, H., Ura, K., Kawamura, H., Adachi, S., Hara, A., Yamauchi, K., 1994. The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM)

concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). Fish Physiol Biochem 13,41-8.

<https://doi.org/10.1007/BF00004118>

North, B., Turnbull, J., Ellis, T., Porter, M., Migaud, H., Bron, J., Bromage, N., 2006.

The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Aquaculture 255, 466–479. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.004>

Oakes, K.D., Kraak, V.D., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations. Aquat Toxicol 63,447–463.

[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)

O'Brien, M., Kruh, G.D., Tew, K.D., 2000. The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. J. Pharmacol. Exp. Ther. 294, 480–487.

Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., 2012. Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. Atlântica 34,57–61 <https://doi.org/10.5088/atlantica.v34i1.2710>

Pelster, B., Wood, C.M., Jung, E., Val, A.L., 2018. Air breathing behavior, oxygen concentrations, and ROS defense in the swimbladders of two erythrinid fish, the facultative air-breathing jeju, and the non-air-breathing traíra during normoxia, hypoxia and hyperoxia. J. Comp Physiol B 188 (3), 437-449. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1142-1>

Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V.C., Oliva-Teles, A., 2012. The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. Comp Biochem Physiol C 155, 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.005>

Pérez-Sánchez, J., Borrel, M., Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldúch-Giner, J.A., Kaushik, S., 2013. Dietary oils mediate cortisol kinetics and the hepatic mRNA expression profile of stress-responsive genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to crowding stress. Implications on energy homeostasis and stress susceptibility. Comp Biochem Physiol D 8, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2013.02.001>

Riche, M.A., Weirich, C.R., Wills, P.S., Baptiste R.M., 2013. Stocking density effects on production characteristics and body composition of market size cobia, *Rachycentron canadum*, reared in recirculating aquaculture systems. J World Aquacult Soc 44(2), 259–266. <https://doi.org/10.1111/jwas.12023>

Rowland, S.J., Mifsud, C., Nixon, M., 2006. Effects of stocking density on the performance of the Australian freshwater silver perch (*Bidyanus bidyanus*) in cages. Aquaculture 253(1–4), 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.049>

Sahin, K., Yazlak, H., Orhan, C., Tuzcu, M., Akdemir, F., Sahin, N., 2014. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. Aquaculture 418, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.009>

Salas-Leiton, E., Anguís, V., Manchado, M., Cañavate, J.P., 2008. Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. Aquaculture 285:84-89.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.001>

Salas-Leiton, E., Anguís, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Cañavate, J.P., Manchado, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the imune response. Fish Shellfish Immunol 28 (2): 296-302.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.006>

Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. J Exp Mar Biol Ecol 269,187–196.

[https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00395-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00395-1)

Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V., Robaldo, R.B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. Aquaculture 262,340–346.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.046>

Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2008. Hormone induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). Aquac Res 39,712-717. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01923.x>

Sánchez, P., Ambrosio, P.P., Flos, R., 2011. Stocking density affects Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) growth independently of size dispersion, evaluated using an

individual photo-identification technique. Aquacult Res 44(2), 231-241.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03026.x>

Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003.

Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00009-5)

Shreck, C.B., 2010. Stress and reproduction: the roles of allostasis and hormesis. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004>.

Sun, H., Wang, W., Li, J., Yang, Z., 2014b. Growth, oxidative stress responses, and gene transcription of juvenile bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) under chronic-term exposure of ammonia. Environ Toxicol Chem 33, 1726–1731.

<https://doi.org/10.1002/etc.2613>

Tallqvist, M., Sandberg-Kilp, E., Bonsdorff, E., 1999. Juvenile flounder, *Paralichthys flesus* (L.), under hypoxia: effects on tolerance, ventilation rate and predation efficiency. J Exper Mar Biol and Ecol. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00096-9)

Trenzado, C.E., Morales, A.E., Palma, J.M., de la Higuera, M., 2009. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. Comp Biochem Physio C 149, 440–447.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.105>

UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.

Van der Thillart, G., Dalla Via, J., Vitali, G., Cortesi, P., 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. Mar Ecol Prog Ser 104, 109-117.

Wang, Y., Chi, L., Liu, Q., Xiao, Y., Ma, D., Xiao, Z., Ma, D., Xiao, Z., Xu, S., Li, J., 2018. Effects of stocking density on the growth and immunity of Atlantic salmon *Salmo salar* reared in recirculating aquaculture system (RAS). J. Ocean. Limnol. 36, 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s00343-019-7350-7>

Wang, X., Dai, W., Xu, M., Pan, B., Li, X., Chen, Y., 2013. Effects of stocking density on growth, nonspecific immune response, and antioxidant status in African catfish (*Clarias gariepinus*). The Israeli Journal of Aquaculture 65, 1–6.

Wasielesky, W., Bianchini, A., Santos, M.H., Poersch, L.H., 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. J World Aquacult Soc 28, 202–204.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1997.tb00857.x>

Wasielesky, W., Bianchini, A., Miranda Filho, K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. Frente Marítimo 17, 43-48.

Webb, Jr.K.A., Hitzfelder, G.M., Faulk, C.K., 2007. Growth of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquaculture system. Aquaculture 264(1–4), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.029>

White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem* 318, 175-180. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00143-X)

Yang, Y., Lin, C.K., 2001. Effects of biomass of caged Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and aeration on the growth and yields in na integrated cage-cum-pond system. *Aquaculture* 195(3–4), 253–267. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00558-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00558-5)

Yarahmadi, P., Miandare, H.K., Hoseinifar, S.H., Gheysvandi, N., Akbarzadeh, A., 2015. The effects of stocking density on hemato-immunological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Int.* 23, 55–63.
<https://doi.org/10.1007/s10499-014-9797-z>

10. CONCLUSÕES

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

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, densidades de estocagem a partir de 150 % PCA devem ser evitadas nos sistemas de produção do linguado *P. orbignyanus*, uma vez que foram capazes de causar estresse nos juvenis. No presente estudo, mesmo que a densidade

de estocagem de 100 %PCA foi a melhor em quanto desempenho zootécnico e tolerância as condições estressantes para os animais, recomenda se que futuros trabalhos sejam realizados avaliando algum antioxidante na elaboração e formulação de ração, o que poderá melhorar o estado fisiológico dos organismos a altas densidades dos organismos e assim incrementar a produtividade da produção aquícola nesta espécie.