

Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Azul de Metileno na ração de tilápia-do-Nilo: tratamento inovador  
para metahemoglobinemia por nitrito**

**Karoline Moreira Barbuio**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra  
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e  
Pastagens

Piracicaba  
2024

**Karoline Moreira Barbuio**  
Bacharela em Medicina Veterinária

**Azul de Metileno na ração de tilápia-do-Nilo: tratamento inovador para  
metahemoglobinemia por nitrito**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **BRUNNO DA SILVA CEROZI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra  
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e  
Pastagens

Piracicaba  
2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Barbui, Karoline Moreira

Azul de Metileno na ração de tilápia-do-Nilo: tratamento inovador para metahemoglobinemia por nitrito / Karoline Moreira Barbui. -- Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 -- Piracicaba, 2024.

62 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Piscicultura 2. Azul de Metileno 3. Nitrito 4. Metahemoglobinemia I. Título

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de São Paulo, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens pela oportunidade de obtenção desse título. À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Professor Dr. Brunno Cerozi, pela oportunidade, pela paciência, pelas conversas, incentivos e orientações fundamentais. Além de toda a confiança depositada em mim e nomeu trabalho.

A todos os professores e pesquisadores que passaram pela minha trajetória durante esse ciclo e contribuíram com o meu desenvolvimento, especialmente ao Professor Dr. José Eurico Possebon Cyrino, por todos os conhecimentos e experiências compartilhados.

À toda a equipe do Setor de Piscicultura da ESALQ, aos técnicos Sérgio Vanderlei Pena e Ismael Baldessin Junior, pelo auxílio na montagem das instalações experimentais, além da amizade e trocas de experiências ao longo desse período. Agradeço também a todos os integrantes do grupo de pesquisa, em especial: Gustavo Hidemi, Laís Libeck, Josué Wenceslau e Stefano Duarte pelo auxílio na execução do experimento.

Aos meus pais e maiores incentivadores, Ângela e Paulo, por terem sido meu alicerce e por sonharem todos os meus sonhos comigo. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e torceram por mim. Em especial minha avó Lourdes (in memorian), que sempre se fez presente e sei que zela por mim independentemente de onde estiver.

A Mariele Pattini, pela amizade de todos esses anos, pelos conselhos e nossas infindáveis conversas. Ao Matheus Lenk, pela parceria, amor, compreensão e todos os incentivos. Aos amigos que encontrei pela vida e tornaram todo esse processo mais leve e feliz, em especial: Leticia Moreira, Juliana Baida, Laura de Vecchi, Gustavo Neves, Camila Sabino, Vitória Gavião, Catarine Martins, Ana Luisa Jacon, Ricardo Yoshio e Robson Silveira.

E por fim, mas não menos importante, a Deus e ao universo por ter chegado até aqui.

## EPÍGRAFE

*“Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”*

*Marie Curie*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>16</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
4.1 INTENSIFICAÇÃO DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO .....	17
4.2 QUALIDADE DA ÁGUA E DINÂMICA DOS COMPOSTOS NITROGENADOS .....	18
4.3 NITRITO .....	20
4.4 MEDIDAS MIGADORAS PARA A REMOÇÃO DO NITRITO .....	24
4.5 AZUL DE METILENO.....	25
4.6 MODELO BIOLÓGICO UTILIZADO.....	28
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
5.1. INSTALAÇÕES E ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	31
5.2 FORMULAÇÃO E CONFEÇÃO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS .....	31
5.3 INTOXICAÇÕES AGUDAS POR NITRITO.....	33
5.4 COLETA DE BIOMARCADORES.....	33
5.5 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	34
5.5.1 PERFIL HEMATOLÓGICO .....	34
5.5.2 METAHEMOGLOBINA .....	35
5.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	35
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
6.1. SINAIS CLÍNICOS DE HIPÓXIA E MORTALIDADE.....	37
6.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	38
6.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	41
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## RESUMO

### **Azul de Metileno na ração de tilápia-do-Nilo: tratamento inovador para metahemoglobinemia por nitrito**

A aquicultura intensiva está susceptível a problemas de qualidade da água, especialmente os causados por compostos nitrogenados. O nitrito é um composto nitrogenado altamente tóxico para os peixes, pois oxida a hemoglobina (Hb) para formar metahemoglobina (MetHb), uma molécula ineficiente no transporte de oxigênio, levando a privação deste aos tecidos e, conseqüentemente, à morte por asfixia. A presença de MetHb resulta em uma coloração sanguínea conhecida como “doença do sangue marrom”. Além disso, a exposição ao nitrito pode desencadear uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e de expressão gênica, assim como alterações metabólicas, cardiovasculares, respiratórias, imunológicas e histopatológicas. Embora existam algumas estratégias para mitigar os impactos adversos do nitrito nos sistemas de aquicultura, até o momento, nenhuma demonstrou a capacidade de reverter o quadro da metahemoglobinemia causado pela intoxicação por nitrito. O azul de metileno (AM) possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e tem sido utilizado no tratamento de MetHb em diversas espécies animais, devido à sua capacidade de converter a MetHb novamente em Hb, revertendo a intoxicação por nitrito. No entanto, até agora, o AM só foi testado apenas por administração intraperitoneal e banhos de imersão para reverter a metahemoglobinemia em peixes, mas como nenhuma dessas vias de administração é viável do ponto de vista comercial, o objetivo deste estudo foi avaliar a administração oral do AM via ração medicamentosa. O ensaio foi conduzido e analisado em um delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e cada tratamento teve uma réplica de aquário, cada aquário contendo 15 peixes, totalizando 60 juvenis de tilápia ( $25\text{g} \pm 1,3$ ). Após um período de aclimação, os peixes passaram a receber as rações experimentais com e sem inclusão de  $10\text{g/kg}$  de AM. Após 5 dias da introdução da ração experimental, foram realizadas intoxicações por nitrito durante 48 horas, com uma concentração de  $20\text{ mg/L}$  nas primeiras 24h e de  $90\text{ mg/L}$  nas 24h antes da coleta. Os biomarcadores quantificados foram sangue e filamentos branquiais. As análises hematológicas sugeriram que os peixes do grupo controle enfrentaram um maior desafio de hipóxia, apresentando médias superiores na concentração de hemoglobina ( $p=0,009$ ) e eritrócitos ( $p=0,017$ ). Isso sugere um mecanismo fisiológico de ação compensatória para reduzir os efeitos da hipóxia, causados pelas maiores concentrações de metahemoglobina ( $p=0,046$ ) e metahemoglobina circulante ( $p=0$ ), enquanto os peixes do grupo medicado com azul de metileno enfrentaram um desafio menor e apresentaram um transporte de oxigênio mais eficiente. Além disso, as análises histológicas das brânquias mostraram que os peixes do grupo AM mantiveram as estruturas branquiais com arquitetura preservada, apresentando apenas lesões de grau leve, enquanto os peixes do grupo controle apresentaram alterações na estrutura padrão e diversas lesões nos tecidos branquiais. Isso sugere que os peixes do grupo controle enfrentaram um ambiente mais desafiador devido à intoxicação por nitrito, enquanto os peixes do grupo AM conseguiram lidar melhor com esse desafio. Conclui-se que o AM administrado por via oral tem a capacidade de auxiliar os peixes a compensar os efeitos causados pela intoxicação por nitrito.

**Palavras-chave:** 1. Piscicultura 2. Azul de Metileno 3. Nitrito 4. Metahemoglobinemia

## ABSTRACT

### **Methylene blue in Nile tilapia feed: innovative treatment for nitrite methemoglobinemia**

Intensive aquaculture is susceptible to a high incidence of water quality issues, particularly those stemming from nitrogen compounds. Nitrite is a highly toxic nitrogen compound for fish, as it oxidizes hemoglobin (Hb) to form methemoglobin (MetHb), an inefficient molecule in oxygen transport, leading to tissue oxygen deprivation and consequent death by asphyxiation. The presence of MetHb results in a characteristic brown blood coloration known as "brown blood disease". Additional effects of nitrite exposure include physiological, biochemical, and gene expression changes, as well as metabolic, cardiovascular, respiratory, immunological, and histopathological alterations. While several strategies exist to mitigate the adverse impacts of nitrite in aquaculture systems, none have yet demonstrated the ability to reverse the methemoglobinemia caused by nitrite poisoning. Methylene blue (MB) possesses antioxidant and anti-inflammatory properties and has been utilized in treating MetHb in various animal species due to its ability to convert MetHb back to Hb, reversing nitrite poisoning. So far, MB has only been tested via intraperitoneal administration and immersion baths to reverse methemoglobinemia in fish. Since neither of these administration routes is commercially viable, the aim of this study was to evaluate the oral administration of MB via medicated feed. The trial was conducted and analyzed in a completely randomized design, with two treatments, each with a replicated aquarium containing 15 fish, totaling 60 tilapia juveniles ( $25\text{g} \pm 1.3$ ). After a acclimatization period, the fish began receiving experimental diets with and without the inclusion of 10g/kg of MB. Five days after the introduction of the experimental diet, nitrite intoxications were performed for 48 hours, with a concentration of 20 mg/L in the first 24 hours and 90 mg/L in the last 24 hours before sampling. Quantified biomarkers included blood and gill filaments. Hematological analyses suggested that fish in the control group faced a greater hypoxia challenge, showing higher means in hemoglobin concentration ( $p=0.009$ ) and erythrocytes ( $p=0.017$ ). This indicates a compensatory physiological mechanism to reduce the effects of hypoxia caused by higher concentrations of methemoglobin ( $p=0.046$ ) and circulating methemoglobin ( $p=0$ ), whereas fish in the MB-treated group faced a lesser challenge and exhibited more efficient oxygen transport. Additionally, histological analyses of the gills revealed that fish in the MB group maintained gill structures with preserved architecture, displaying only mild-grade lesions, while those in the control group showed alterations in the standard structure and various lesions in gill tissues. This suggests that fish in the control group faced a more challenging environment due to nitrite intoxication, whereas fish in the MB group coped better with this challenge. In conclusion, orally administered MB has the capacity to assist fish in compensating for the effects caused by nitrite poisoning.

**Keywords:** 1. Pisciculture 2. Methylene Blue 3. Nitrite 4. Methemoglobinemia



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fontes de entrada e saída de nitrogênio em um sistema de cultivo.....	19
Figura 2. Ação fisiológica do nitrito em peixes.....	21
Figura 3. A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno.....	27
Figura 4. Processos da produção da ração sendo (A) Moinho de ingredientes (B) Homogeneizador de ingredientes (C) Processo de extrusão da ração e (D) Ração sendo seca em estufas.....	32
Figura 5. Rações peletizadas sendo (A) Ração medicada com a inclusão de 10g/kg de Azul de Metileno e (B) Ração Controle.....	32
Figura 6. Coleta de biomarcadores, sendo (A) Coleta de sangue via punção da veia caudal e (B) Local de secção dos filamentos branquiais e (C) Tubos com amostras de filamento branquial.....	33
Figura 7. Análises de Perfil Hematológico, sendo (A) Carregamento do hemocitômetro Neubauer com a amostra diluída de sangue com a solução de Natt-Herrick, (B) Grade de linhas perpendiculares do hemocitômetro Neubauer para a contagem de eritrócitos vista pela lente do microscópio e (C) Tubos capilares após microcentrifugação para a determinação do valor do hematócrito.....	34
Figura 8. Exame histológico das lâminas dos tecidos branquiais.....	36
Figura 9. Peixes do tratamento controle que apresentaram sinais clínicos característicos de um quadro de hipóxia causado pela intoxicação por nitrito.....	37
Figura 10. Coloração das brânquias dos peixes, sendo: (A) Peixes do tratamento medicado com azul de metileno e (B) Peixes do tratamento controle.....	38
Figura 11. Fotomicrografia das brânquias dos peixes do grupo medicado com azul de metileno (AM). Sendo (A) Filamentos branquiais com arquitetura preservada e sem alterações severas, apresentando apenas uma lamela tortuosa em ponto focal; (B) Filamentos preservados e sem alterações severas, apresentando apenas lamelas branquiais tortuosas em pontos multifocais e (C) Filamentos preservados e sem alterações.....	43
Figura 12. Fotomicrografia de brânquias dos peixes do grupo controle (C). Sendo que em todas as imagens é possível observar perdas da estrutura lamelar padrão (A) Região de fusão lamelar (setas pretas) e Deslocamento epitelial (setas brancas); (B) Aneurisma lamelar (estrela preta); (C) Aneurisma lamelar (estrela preta) e Edema lamelar (triângulos pretos); Congestão capilar (setas vermelhas) e (D) Espessamento epitelial, hiperplasia celular e proliferação de células mucosas (triângulos brancos); Congestão capilar (setas vermelhas) e Hipertrofia leve (asterisco preto).....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação das rações experimentais.....	32
Tabela 2. Parâmetros hematológicos das tilápias alimentadas com as rações experimentais .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\text{NO}_2^-$	Nitrito
Hb	Hemoglobina
MetHb	Metahemoglobina
MetHbC	Metahemoglobina Circulante
Er	Eritrócitos
Htc	Hematócrito
Ptn	Proteína total
VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
$\text{Fe}^{2+}$	Estado ferroso do ferro
$\text{Fe}^{3+}$	Estado férrico do Ferro
$\text{O}^2$	Oxigênio
$\text{N}_2\text{O}$	Óxido nitroso
AM	Azul de Metileno
RAS	Sistema de Recirculação de Água
$\text{NH}_4^+$	Amônia
FDA	Federal Drug Administration

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial está em constante expansão, que resulta em uma alta demanda por alimentos. Nesse contexto, a aquicultura desempenha um importante papel na garantia da segurança alimentar e nutricional, sendo o setor de produção de proteína animal que mais cresceu nas últimas três décadas (FAO, 2023). A intensificação da aquicultura é uma estratégia para atender a esse crescimento (DAS et al., 2004), mas, em sistemas intensivos, problemas relacionados à qualidade da água são frequentemente observados. Os peixes necessitam da água para realizar todas as suas funções vitais e entre as variáveis de qualidade da água mais impactantes para a saúde dos peixes podemos citar a presença de compostos nitrogenados tóxicos (MIRANDA-FILHO et al., 2009; MIRANDA-FILHO E COSTA, 2015).

O nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é um composto nitrogenado altamente tóxico, e em sistemas fechados com altas densidades de estocagem, pode atingir níveis letais rapidamente (YANBO et al. 2006). A ação fisiológica deste composto, está associada à sua interação com a hemoglobina (Hb) (ALATORRE-JÁCOME et al., 2011). O  $\text{NO}^-$  é consumido em reações com a Hb, causando oxidação do ferro presente na molécula, transformando-a do estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para o estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (KOSAKA E TYUMA, 1987), produzindo metahemoglobina (MetHb) (KOSAKA E TYUMA, 1987, JENSEN, 2009), uma molécula que não possui a capacidade de transportar oxigênio ( $\text{O}_2$ ) de forma eficiente, fazendo com que os peixes sofram hipóxia (MASSER et al., 1999, NOGA, 2010). Essa oxidação confere uma coloração marrom ao sangue (SCARANO ET AL., 1984; MASSER et al., 1999; NOGA 2010).

Intoxicações por nitrito podem desencadear mudanças fisiológicas, bioquímicas e de expressão gênica, além de alterações metabólicas (MIAO et al., 2018) cardiovasculares, respiratórias, (KROUPOVA et al., 2013; KROUPOVA et al., 2005; JENSEN, 2003), imunológicas (ABUHARFEIL et al., 2001; GAO et al., 2020) e histopatológicas (NEGARCHI et al., 2018). Além de todos os impactos negativos à saúde dos peixes, o nitrito também pode favorecer a emissão de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) nos sistemas de aquicultura. Entretanto, o nitrito não representa apenas uma ameaça potencial para a indústria da aquicultura, mas também constitui um desafio significativo para o meio ambiente global.

A toxicidade do nitrito é frequentemente encontrada nos sistemas de aquicultura, entretanto diferentes abordagens e estratégias para remoção desse composto foram desenvolvidas e avaliadas. A principal medida adotada é a técnica de adição de sais (KOZÁK et al. 2005; SHINN et al. 2013), que quando adicionados à água, reduzem a toxicidade do nitrito (YANBO et al., 2006) por competirem pelos mesmos sítios de absorção nas células das brânquias e do epitélio intestinal (TOMASSO, 1994), proporcionando uma ação protetora (STORMER et al., 1996). Porém, este efeito protetor não é uniforme entre as espécies (LEWIS & MORRIS 1986). Além disso, os sais podem diminuir a eficiência do biofiltro em RAS (MASSER et al., 1999), e afetar o desempenho das plantas em sistemas aquapônicos

(MUNNS & TERMAAT, 1986). Existem outras estratégias mitigativas para os impactos adversos desse composto. No entanto, é importante destacar que estas tecnologias ainda não estão consolidadas e nenhuma delas demonstrou a capacidade de reverter de maneira eficaz o quadro de metahemoglobinemia causado pela intoxicação pelo nitrito.

O Azul de Metileno (AM) possui uma ampla gama de utilizações (PINHEIRO, 2020) destacando entre uma das principais indicações clínicas o tratamento da metahemoglobinemia em humanos e outras diversas espécies animais (SCHIRMER, 2011). Em humanos, o AM possui a capacidade de ativar o sistema enzimático alternativo e reduzir o azul de metileno a azul de leucometileno, que possui a capacidade de converter a metahemoglobina (methb) novamente em hemoglobina (hb) (HAYMOND, 2005). Estima-se que o AM possa acelerar a taxa de conversão de methb em hb em, aproximadamente, seis vezes (BRADBERRY, 2003).

Na aquicultura, o AM também é frequentemente utilizado como desinfetante (ŠAFARŤÍK, 2002), antifúngico e antiparasitário (PICON-CAMACHO ET AL. 2012). E alguns autores tiveram êxito ao utilizar AM como uma forma de tratamento para a intoxicação por nitrito na aquicultura. Bortz (1976) demonstrou sucesso na administração via intraperitoneal. Wedemeyer e Yasutake (1978) e Vršková e Knotek (2008) alcançaram resultados positivos na administração via banho de imersão. Entretanto, nenhuma dessas vias de administração (injeção intraperitoneal e banho de imersão) são práticas viáveis do ponto de vista de produção comercial.



## **2. HIPÓTESE**

O Azul de Metileno é capaz de converter a metahemoglobina novamente em hemoglobina, apresentando o potencial de prevenir ou auxiliar o peixe a compensar os efeitos nocivos da intoxicação por nitrito.





### **3. OBJETIVO**

Avaliar uma ração medicada com azul de metileno em sua capacidade antioxidante de converter metahemoglobina em hemoglobina diante de um quadro de intoxicação aguda por nitrito em peixes.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Intensificação dos Sistemas de Produção

A população mundial está em constante expansão, com estimativas de que, nas próximas décadas, possa atingir a marca de 9,7 bilhões de pessoas. Esse aumento populacional resulta em uma demanda cada vez maior por alimentos. Nesse contexto, a aquicultura se destaca, pois sua expansão supera o crescimento da população mundial, sendo reconhecida como uma atividade importante para a garantia da segurança alimentar e nutricional (ALLISON, 2011; BÉNÉ et al., 2016). Além disso, os efeitos benéficos e a importância do pescado na dieta humana têm sido demonstrados no contexto da segurança alimentar, incluindo o combate à desnutrição e às deficiências de micronutrientes nos países em desenvolvimento (MOHANTY et al., 2019).

Entre os anos 1990 e 2020, a aquicultura mundial cresceu 609%, sendo considerada o setor de produção de proteína animal que mais cresceu no mundo (FAO, 2023). Além de ser uma das formas mais ambientalmente eficientes de produção de proteína animal, e ser considerada uma solução viável para a escassez de alimentos, apresenta a melhor conversão de ração em biomassa corporal estimada em 30%, em comparação com 18% em aves e 13% em suínos (GUPTA, 2018). A produção aquícola global atingiu a marca de 82,1 milhões de toneladas em 2018, das quais a aquicultura interior produziu 51,3 milhões de toneladas (62%), enquanto a pesca atingiu 30,8 milhões de toneladas (38%). Devido ao cenário de estagnação da pesca extrativista, a produção aquícola intensiva é desafiada a se expandir (FAO, 2020).

O intenso aumento produtivo das pisciculturas, associado à escassez hídrica, gera maior preocupação com os recursos ambientais (COSTA et al., 2008). A intensificação da aquicultura é uma estratégia essencial para atender a essa necessidade projetada, uma vez que os recursos terrestres estão se esgotando para sua expansão (DAS et al., 2004). A FAO (2022) propõe uma transformação azul da aquicultura, com o intuito de promover a transformação sustentável do sistema aquícola, mantendo a saúde do ecossistema aquático, reduzindo a poluição, protegendo a biodiversidade e promovendo a igualdade social. No entanto, os sistemas tradicionais de aquicultura extensiva dependem excessivamente dos espaços naturais e são propensos a diversos fatores externos relacionados a doenças e poluição da água, o que não condiz com o desenvolvimento sustentável da aquicultura (TIMONS, 2002).

A tecnologia dos sistemas de recirculação de água (RAS) está em constante expansão devido ao seu excelente desempenho na produção de peixes e no controle adequado de poluentes aquícolas (FAO, 2020). Esse método intensivo e moderno de aquicultura é baseado na reciclagem da água, visando a utilização eficiente e sustentável dos recursos hídricos naturais. Em RAS, as condições ambientais podem ser controladas a fim de manter os principais parâmetros de qualidade da água, preservando

a saúde e as taxas de crescimento ideais para os organismos cultivados. Além disso, a utilização de água é 90% a 99% menor do que a dos métodos tradicionais (TIMONS E EBELING, 2010). Em contrapartida, sabe-se que, se o tratamento da água não for adequadamente controlado, a qualidade da água irá se deteriorar (MOLLEDA et al., 2007).

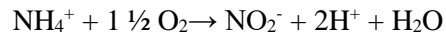
#### **4.2. Qualidade da Água e Dinâmica dos Compostos Nitrogenados**

Os peixes são intrinsecamente dependentes da água para realizar suas funções vitais, portanto, conhecer as características físicas, químicas e biológicas da água é fundamental para o bom desenvolvimento dos organismos aquáticos e para a garantia de uma produção economicamente viável. A qualidade da água garante um cultivo eficaz de organismos aquáticos (CARBAJAL-HERNANDEZ et al., 2013). Espera-se que os peixes confinados atendam a expectativas da produção comercial, como máxima sobrevivência, boa conversão alimentar e altas taxas crescimento (SÁNCHEZ E MATSUMOTO, 2012).

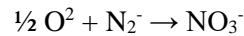
Com a intensificação dos sistemas de criação, conseqüentemente os problemas relacionados à qualidade da água passaram a ser observados com frequência (COSTA et al., 2008). Diversos fatores podem estar relacionados à qualidade da água na piscicultura, como manejo, espécie de cultivo, quantidade e composição da ração fornecida. A água pode ter suas características químicas mantidas ou modificadas, sendo frequentemente influenciada pelo aporte de matéria orgânica e nutrientes dentro do sistema (BOYD, 1982; THORNTON, KIMMEL E PAYNE, 1990). As variáveis de qualidade de água mais relevantes e impactantes para a saúde dos peixes são o oxigênio dissolvido e a presença de compostos nitrogenados tóxicos, como amônia e nitrito (BOYD, 1982; MIRANDA-FILHO et al., 2009; MIRANDA-FILHO E COSTA, 2015).

Em sistemas intensivos de produção, é comum que os peixes sejam alimentados com dietas formuladas com elevados teores de proteínas. Nesse contexto, uma proporção significativa dessa proteína é absorvida e armazenada no organismo dos peixes como proteína animal. Entretanto, o excesso de ingestão proteica leva ao seu catabolismo, gerando corpos cetônicos ou ácidos graxos, que são utilizados como fonte energética, e o nitrogênio amoniacal, que é a principal forma de excreta nitrogenada dos peixes (BALDISSEROTO, 2018). Dietas para peixes podem conter 25 a 65% de proteína, correspondendo de 4,1 a 10,7% de nitrogênio. O nitrogênio retido pelos peixes é apenas de 20 a 30%, assim, a maior parte do nitrogênio é excretada na água (LOVELL, 1988). Em ambientes aquáticos, o nitrogênio pode ser encontrado em diferentes formas (SIPAÚBA-TAVARES, 1998; BALDISSEROTO, 2002).

A amônia ( $\text{NH}_3^+$ ), produto do catabolismo de proteínas, sofre um processo de oxidação por bactérias oxidantes de amônia (AOB) (*Nitrosomonas spp.*), sendo transformada em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Baldisserotto, 2018):



O nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), ao sofrer a ação de bactérias oxidantes de nitrito (NOB) (*Nitrobacter spp.*) é convertido a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ):



Os compostos nitrogenados tóxicos para organismos aquáticos são a amônia e o nitrito (MIRANDA-FILHO et al., 2009; MIRANDA-FILHO E COSTA, 2015). Esses poluentes são naturalmente encontrados na água devido à excreção de animais aquáticos, sendo mais prevalentes em sistemas de produção com altas densidades (JENSEN, 2003; PARK et al., 2007), devido à degradação de rações não consumidas (PEYGHAN E AZARY-TAKAMY, 2002) ou a desequilíbrios no processo de nitrificação bacteriana (DEANE & WOO, 2007). A exposição dos peixes aos compostos nitrogenados pode ocorrer por exposições agudas ou crônicas (RANDALL E TSUI, 2002). Sendo que exposições agudas podem ser letais para os peixes, enquanto exposições crônicas podem gerar redução no crescimento ou suprimir o sistema imunológico (Hargreaves, 1998).

A bactéria *Nitrosomonas spp.*, responsável pela conversão de amônia em nitrito, tem melhor desempenho em temperaturas entre 15 e 20°C. No entanto, as bactérias *Nitrobacter spp.*, que transformam nitrito em nitrato, têm um desempenho inferior nessas temperaturas e preferem uma faixa de pH de 7,5 a 8,6 com pelo menos 1 mg/L de oxigênio dissolvido. Portanto, é relatado um aumento na toxicidade do nitrito em condições de pH mais baixo e temperatura fria em vários teleósteos e crustáceos (HUEY et al., 1984; CHEN & CHENG, 2000).

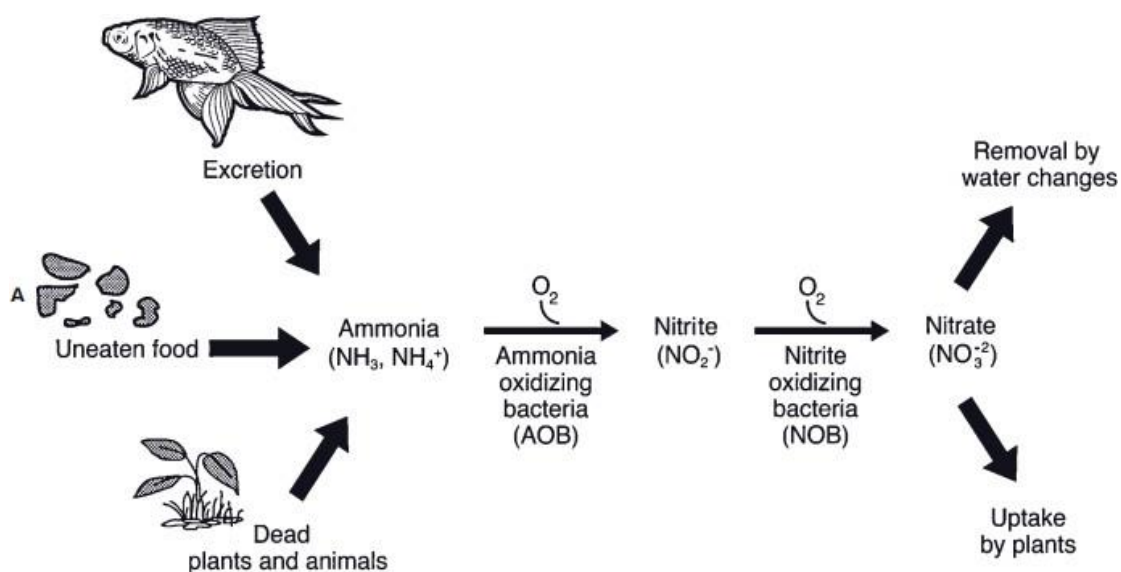


Figura 1 – Principais fontes de entrada e saída de nitrogênio em um sistema de cultivo (Adaptado de Noga, 2010).

### 4.3. Nitrito

O nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), presente nos ecossistemas como parte do ciclo natural do nitrogênio, pode se tornar um problema potencial em ambientes aquáticos devido à sua alta toxicidade (KROUPOVA et al., 2013; KROUPOVA et al., 2005; LEWIS E MORRIS, 1986). Altas concentrações de nitrito em curtos períodos podem ser observadas em criações intensivas de peixes comerciais e em aquários de peixes ornamentais, podendo ocorrer logo no início da criação, quando as bactérias do filtro biológico ainda não estão bem estabelecidas, resultando em uma filtragem biológica ineficaz (AVNIMELECH et al. 1986; SVOBODOVÁ et al. 2005; GAO et al., 2020), nesses casos a intoxicação por nitrito pode ser conhecida vulgarmente como “Doença do sistema novo” ou “Doença do aquário novo”. Altas concentrações de nitrito, também podem ocorrer pela oxidação da amônia em ambientes oxidantes ou pela redução do nitrato em ambientes redutores, sendo a oxidação da amônia em ambientes oxidantes, a fonte mais predominante em sistemas aquícolas. Em sistemas com altas densidades, os níveis de nitrito podem aumentar rapidamente, atingindo concentrações que podem ser letais aos peixes (YANBO et al. 2006).

As implicações dos nitritos são mais prováveis de ocorrer em sistemas fechados de cultura intensiva devido a sistemas de filtração ineficientes ou avariados para remover resíduos de amônia da água através da nitrificação (KROUPOVA et al. 2005). Além disso, em sistemas de recirculação de água, a irradiação ultravioleta é comumente utilizada para desinfetar a água, podendo também ser uma fonte adicional de nitrito se a água tratada apresentar níveis elevados de nitrato. Isso ocorre pois a irradiação ultravioleta pode converter o nitrato em nitrito (KROUPOVA et al. 2018; LU et al. 2009; SHARRER et al. 2005).

Alguns organismos aquáticos podem ser muito suscetíveis à intoxicação por nitrito devido à absorção deste composto diretamente através das brânquias, resultando em altas concentrações nos fluidos corporais (JENSEN, 1995). A maioria dos peixes de água doce expostos ao nitrito, acumulam ativamente esse íon em seu plasma (JENSEN, 2003). Concentrações de nitrito no plasma sanguíneo dos peixes podem atingir níveis até 60 vezes maiores do que os da água circundante (FONTENOT et al. 1999). Em menor quantidade, os nitritos também se acumulam em alguns tecidos de peixes, como brânquias, fígado, cérebro e músculos (MARGIOCCO et al. 1983).

A ação fisiológica do nitrito nos peixes está essencialmente associada à sua interação com a hemoglobina (ALATORRE-JÁCOME et al., 2011). Na corrente sanguínea, o nitrito atravessa a membrana dos glóbulos vermelhos e dentro da hemácia, é consumido em reações com a hemoglobina (Hb) (JENSEN E ROHDE, 2010). As reações causam oxidação do ferro presente na molécula de Hb, transformando-a do estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para o estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (KOSAKA E TYUMA, 1987), produzindo metahemoglobina (MetHb) (KOSAKA E TYUMA, 1987, JENSEN, 2009). A metahemoglobina, diferentemente da hemoglobina, é incapaz de se ligar ao oxigênio e transportá-lo para os tecidos. Dessa forma, os peixes afetados pela toxicidade do nitrito, perdem a capacidade de transportar oxigênio de forma eficiente, gerando uma privação aos tecidos e fazendo com que os peixes

sofram hipóxia (Figura 2) (KIESE, 1974, WILLIAMS E EDDY, 1986; LEWIS E MORRIS, 1986, MASSER et al., 1999, NOGA, 2010). Sendo esse o principal problema de saúde dos peixes causado pela exposição ao nitrito.

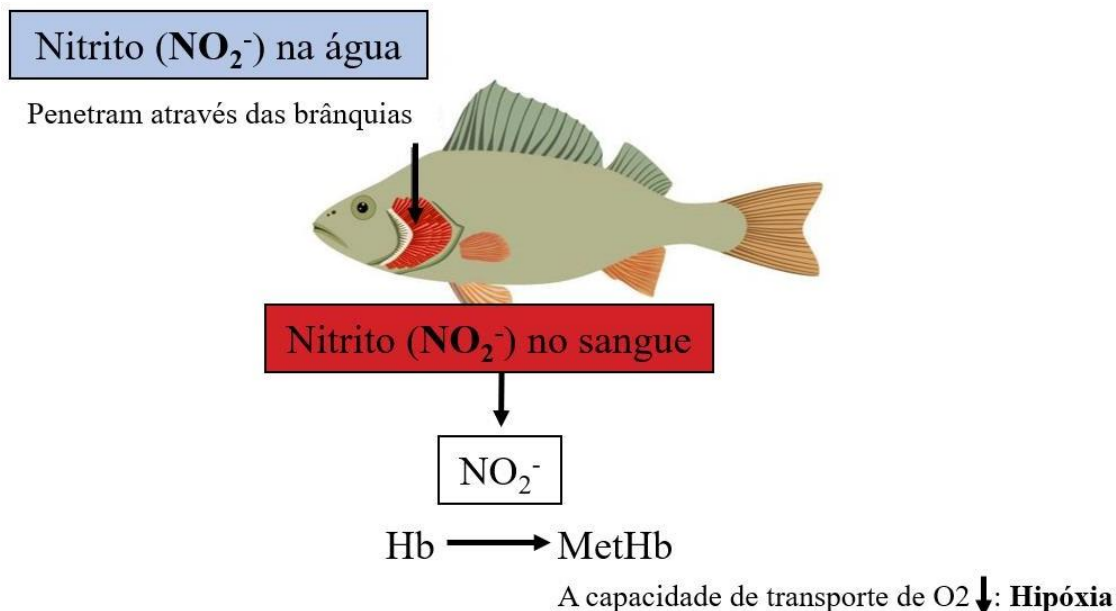


Figura 2 – Ação fisiológica do nitrito em peixes (Fonte: Própria autora).

A oxidação da hemoglobina em metahemoglobina confere uma coloração marrom ao sangue (KHADKA, 2021; NOGA, 2010). Em consequência disso, peixes em quadros de intoxicação por nitrito geralmente apresentam também alteração na coloração das brânquias, que podem apresentar colorações próximas ao marrom. Por esse motivo, a intoxicação por nitrito também pode ser conhecida como “Doença do sangue marrom” (WEDEMEYER, 1996).

As concentrações normais de metahemoglobina no sangue variam de 1 a 3%, sendo consideradas indesejáveis concentrações acima de 10%, com sinais clínicos surgindo entre 25 e 50% (BOWSER, 1984). Concentrações em torno de 25 a 30% geralmente já conferem ao sangue uma coloração levemente marrom, mas para que a coloração marrom seja visível e as brânquias apresentem alterações na coloração, as concentrações devem atingir aproximadamente 40% (NOGA, 2010), sendo que a morte ocorre em concentrações superiores a 70% (SVOBODOVÁ et al., 2008).

A toxicidade do nitrito para os peixes é substancialmente afetada por diversos fatores internos e externos. Os fatores externos mais importantes incluem a qualidade da água, destacando fatores cruciais como a temperatura da água, a saturação de oxigênio, as concentrações de cátions ânions, em particular as concentrações de cloretos e a duração da exposição (SVOBODOVÁ et al. 2005; KROUPOVÁ et al. 2006). Fatores internos importantes incluem a espécie de peixe, idade, tamanho e sensibilidade individual (EDDY et al. 1983; PALACHEK E TOMASSO, 1984; WILLIAMS & EDDY,

1988; BARTLETT E NEUMANN, 1998; AGGERGAARD & JENSEN, 2001). Enquanto alguns peixes podem apenas ter uma redução em seu desempenho zootécnico, outros podem ficar letárgicos, e há casos em que ocorre morte súbita.

Os sinais clínicos clássicos em quadros hipóxia aguda são aglomeração de peixes perto da superfície da água ou perto da fonte de água, tubulações e taquipneia (NOVOTNY, 2021). Além disso, autores relatam que alguns peixes em condição de hipóxia não apresentam esses sinais clássicos a fim de escapar do ambiente hipóxico e não sobem até a superfície da água para recorrer à respiração aérea, apenas permanecem estáticos no fundo do tanque para economizar energia para enfrentar a hipóxia (ISRAELENSE E KIMMEL, 1996; WU, 2002; DOUXFILS et al. 2012). Os peixes que morreram por asfixia têm a boca bem aberta e os opérculos alargados. A hipóxia crônica causa anorexia, reduzir o crescimento, prejudicar a reprodução e aumenta a suscetibilidade a infecções (NOVOTNY, 2021).

Peixes com níveis elevados de metahemoglobina podem morrer por asfixia, devido a dois mecanismos distintos. Os primeiros peixes podem manifestar uma síndrome de anemia funcional e, em casos de exposição prolongada ao nitrito, também correm o risco de morrer por síndrome de anemia hemolítica. Em um experimento realizado para estudar a dinâmica da recuperação da anemia funcional e hemolítica em robalos (*Dicentrarchus labrax*), concluíram que poucas horas após a exposição a uma dose de 150 mg/l de  $\text{NO}_2^-$ -N na água marinha (concentração considerada letal em 96 horas), os peixes apresentaram de 75 a 80% da hemoglobina total oxidada a metahemoglobina, reduzindo consideravelmente a oxigenação nos tecidos. Esta condição foi chamada de “anemia funcional” para diferenciá-la da “anemia hemolítica” que é observada somente 24 horas após o início da intoxicação, quando se observa uma redução acentuada da hemoglobina total. A concentração mais baixa capaz de causar anemia hemolítica no robalo após 96 horas de exposição é de 50 mg/l de  $\text{NO}_2^-$ -N (SCARANO E SAROGLIA, 1984).

Intoxicações por nitrito podem desencadear uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e de expressão gênica em diversos órgãos dos peixes, além de alterações metabólicas (MIAO et al., 2018) incluindo a regulação de íons, a atividade cardiovascular, a respiração, a função endócrina e a excreção (KROUPOVA et al., 2013; KROUPOVA et al., 2005; JENSEN, 2003). Além disso, podem gerar danos histopatológicos em órgãos, como hiperplasia e hipertrofia em células epiteliais branquiais, atrofia de hepatócitos em áreas hemorrágicas no fígado e necrose em células hepáticas, além de lesão do corpúsculo renal, degeneração severa das células dos túbulos renais, hemorragia e difusão de eritrócitos no líquido intersticial (NEGARCHI et al., 2018).

Também são relatadas alterações na atividade de enzimas antioxidantes (LIN et al., 2018), no sistema endócrino (GAO et al., 2019) e imunológico nos peixes (GAO et al., 2020). Os mecanismos de toxicidade e os impactos fisiológicos do nitrito têm sido extensivamente examinados em inúmeras espécies de peixes e tipos celulares. A ação do nitrito na hemoglobina, ao aumentar os níveis de

metahemoglobina no sangue, resulta em uma elevação na carga de filtração e na redução da funcionalidade do baço (GLADWIN et al., 2004; KIM-SHAPIRO et al., 2005; COSBY et al., 2003). Além de influenciar a resposta imunológica no baço, esse processo ativa ou suprime a expressão de certos genes relacionados à imunidade (ABUHARFEIL et al., 2001).

Em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), sugere-se que o nitrito pode prejudicar a imunidade dos peixes contra a infecções bacterianas. Isso ocorre porque o nitrito diminuiu a viabilidade celular dos leucócitos da tilápia contra a bactéria, resultando em um aumento na produção de óxido nítrico e regulando a autofagia, fornecendo uma possível explicação para o surto de doenças bacterianas em peixes em aquicultura intensiva (ZHAO et al., 2020). Altos níveis de metahemoglobina resultam na formação de óxido nítrico a partir do nitrito (ZWEIER et al. 1999) que pode potencialmente inibir vários componentes da via esteroidogênica (DELAFORGE et al. 1995; DELPUNTA et al. 1996).

Em carpas (*Cyprinus carpio*) submetidas à exposição aguda de nitrito, observa-se de dano oxidativo, perturbações no retículo endoplasmático, ocorrência de autofagia e apoptose, gerando danos histológicos no epitélio branquial (LIU et al., 2022). Simultaneamente, um estudo realizado com machos de zebrafish (*Danio rerio*) evidenciou que a exposição ao nitrito desencadeia estresse oxidativo no baço dos peixes, promovendo uma redução significativa aos níveis de transcrição de proteínas, enzimas e citocinas, intensificando lesões esplênicas e impactando a imunidade inata dos peixes (LIN et al., 2018).

O nitrito também pode exercer influência sobre o sistema nervoso dos peixes, desencadeando alterações comportamentais, como natação instável. Além disso, é capaz de modificar a expressão de genes relacionados à síntese de neurotransmissores e à transdução de sinal (KROUPOVA et al., 2005). Essa influência do nitrito não se limita ao sistema nervoso, estendendo-se também ao fígado e aos rins, órgãos essenciais envolvidos na desintoxicação e remoção de resíduos metabólicos (CHENG et al., 2020). Além disso, o nitrito demonstra efeitos adversos no funcionamento do sistema muscular e do sistema digestivo dos peixes (CAMPBELL E COLGAN, 2019).

Peixes marinhos são mais tolerantes a intoxicações por compostos nitrogenados (Camargo et al. 2005). No entanto, estudos em diversas espécies marinhas relatam que níveis elevados de nitritos reduziram o crescimento (SIIKAVUOPIO & SÆTHER, 2006), aumentaram a formação de metahemoglobina (SCARANO & SAROGLIA, 1984), causaram distúrbios osmorregulatórios (DEANE & WOO, 2007) e alteraram a fisiologia normal dos peixes (GROSELL & JENSEN, 2000). Vários estudos descreveram uma correlação positiva entre a concentração de nitritos no sangue e a formação de metahemoglobina em salmonídeos, ictalurídeos e ciprinídeos (BATH & EDDY, 1980; HUEY & BEITINGER, 1982). Em peixes marinhos, a absorção de nitritos possivelmente ocorre através do epitélio intestinal e branquial (GROSELL & JENSEN, 2000; JENSEN, 2003; DEANE & WOO, 2007; TOMASSO, 2012).



Além de todos os impactos negativos que o nitrito representa para a saúde dos peixes, em sistemas de produção integrados como a aquaponia, que consiste na junção da hidroponia com a aquicultura para produzir simultaneamente produtos vegetais e animais, através do aproveitamento dos resíduos dos sistemas aquícolas como nutrientes para as plantas (LOVE, 2014), o nitrito pode afetar negativamente o desempenho das plantas até mesmo em baixas concentrações (OKE, 1966; CEROZI, 2016).

O nitrito também pode representar uma ameaça em potencial para a sustentabilidade dos sistemas de aquicultura, por desempenhar um papel significativo na emissão de óxido nitroso ( $N_2O$ ). A aquicultura pode se tornar uma fonte antropogênica importante do gás de efeito estufa óxido nitroso, que possui potencial de aquecimento global 310 vezes superior ao do dióxido de carbono ao longo de uma vida útil de 100 anos. Durante os processos de nitrificação e desnitrificação microbiana, o  $N_2O$  é gerado e liberado na atmosfera. O fator médio de emissão de  $N_2O$  nos sistemas de aquicultura é calculado em 1,69 g de  $N_2O$  por kg de peixe produzido (Hu et al., 2012). Conseqüentemente, o nitrito não representa apenas uma ameaça potencial para a indústria da aquicultura, mas também constitui um desafio significativo para o meio ambiente global.

#### **4.4. Medidas mitigadoras para a remoção do nitrito**

A toxicidade do nitrito é inevitável nos sistemas de aquicultura, entretanto diferentes abordagens e estratégias para remoção dessa substância foram desenvolvidas e avaliadas. A principal medida adotada é a técnica de adição de sais de cloreto. Estudos com animais aquáticos enfocam efeitos dos cloretos na água (KOZÁK et al. 2005; SHINN et al. 2013). Os cloretos (cálcio e sódio), quando adicionados à água, reduzem a toxicidade do nitrito (YANBO et al., 2006). Isso ocorre, pois, o nitrito e cloretos competem pelos mesmos sítios de absorção nas células das brânquias e do epitélio intestinal (TOMASSO, 1994). Ou seja, a presença de cloretos na água proporciona uma ação protetora contra a absorção ativa de nitrito (STORMER et al., 1996). Os nitritos atuam como um inibidor competitivo da absorção de cloretos, e vice-versa (CRAWFORD & ALLEN, 1977; WILLIAMS & EDDY, 1986; HARRIS & COLEY, 1991).

A aplicação de cloreto previne a toxicidade do nitrito e as alterações fisiológicas associadas (TUCKER E HARGREAVES, 2004), porém, este efeito protetor não é uniforme entre as espécies (LEWIS & MORRIS, 1986). Estudos de caso mostraram incidência de problemas de saúde e mortalidade em diferentes espécies de peixes (bagre, tenca e tilápia) expostos a aplicação de cloretos (SVOBODOVA et al., 2005a). No entanto, sabe-se que a utilização de cloretos a fim de mitigar a intoxicação por nitrito é viável para peixes que podem tolerar alta salinidade e íons cloreto. Em peixes de água doce, o próprio aumento da salinidade induz estresse devido às variações da pressão osmótica e pode levar a desequilíbrios fisiológicos.

A sensibilidade dos peixes ao nitrito está relacionada com a taxa de absorção de cloreto. Dessa forma, peixes com altas taxas de absorção de cloreto branquial, como truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), peixe-pique (*Esox lucius*), peixe-poleiro (*Perca fluviatilis*) e bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) são mais suscetíveis à exposição ao nitrito do que espécies com baixas taxas de absorção de cloretos, como a enguia europeia (*Anguilla anguilla*), carpa-comum (*Cyprinus carpio*), tenca (*Tinca tinca*) e azulão (*Lepomis macrochirus*) (WILLIAMS & EDDY 1986; TOMASSO, 1988; GROSELL, 2005). O mecanismo de captação de nitrito também explica por que o aumento dos níveis de cloretos na água protege os peixes da absorção de nitrito e seus efeitos tóxicos (JENSEN, 2003).

Além dos possíveis problemas à saúde dos peixes, os sais podem diminuir a eficiência do biofiltro em sistemas de recirculação de água (MASSER et al., 1999). Além disso, a utilização de cloreto de sódio em sistemas aquaponicos pode ser desvantajoso, pois a salinidade afeta o desempenho das plantas, causando estresse hídrico, toxidez provocadas por íons e gerando desequilíbrios nutricionais (MUNNS & TERMAAT, 1986). A cultura da alface apresenta menores taxas de crescimento à presença elevada de sais em soluções de cultivo hidropônicos (SOARES, 2010).

Uma outra prática comum para remoção de nitrito é a troca regular de água (LOSORDO & TIMMONS 1994; BOYD & TUCKER, 1998). No entanto, a troca de água em grandes quantidades é trabalhosa e onerosa, levando ao aumento do custo de produção. Além de causar estresse aos peixes, aumentar o risco de propagação de doenças e de eutrofização nos rios e nas águas costeiras. Entretanto, o descarte de águas efluentes contendo altos níveis de nitrito tóxico para o meio ambiente não é uma prática sustentável (VAN BREEMEN & VAN DIJK, 1988). Assim, essa prática não é aconselhável para mitigar a toxicidade dos nitritos em sistemas de aquicultura.

Existem outras estratégias que buscam mitigar os impactos adversos do nitrito nos sistemas de aquicultura, tais como métodos eletroquímicos para o tratamento de águas residuais, a aplicação de probióticos comerciais e a incorporação dietética de diversos antioxidantes. No entanto, é importante destacar que estas tecnologias ainda não atingiram uma consolidação significativa, e nenhuma delas demonstrou, até o momento, a capacidade de reverter de maneira eficaz o quadro da metahemoglobinemia causado pela intoxicação pelo nitrito.

#### **4.5. Azul de Metileno**

O azul de metileno (AM), ou cloreto de metiltionínio, foi a primeira droga sintética a ser utilizada na medicina e possui uma ampla gama de utilizações (PINHEIRO, 2020). Em 1891 foi utilizado para o tratamento da malária (VENNERSTROM et al., 1995). É um dos componentes da famosa solução Giemsa para coloração e caracterização de parasitas e células sanguíneas (BARCIA, 2007). Diversas outras descobertas microscópicas foram baseadas nas propriedades bioquímicas do AM. Além de

desempenhar um importante papel no início da pesquisa moderna sobre medicamentos, o AM despertou questionamentos entre os pesquisadores, pois a preferência do composto por corar patógenos levou à especulação de que essa coloração poderia indicar um efeito específico sobre o patógeno que poderia ser explorado para combater doenças. Isto explica por que os termos “droga” e “corante” foram usados como sinônimos até a Primeira Guerra Mundial (KRISTIANSEN, 1989). Além dos citados, o tratamento da metahemoglobinemia está entre uma das principais indicações clínicas para o uso do azul de metileno em humanos (SCHIRMER, 2011). As indicações terapêuticas do azul de metileno são aprovadas pela FDA (Federal Drug Administration) e estão sendo direcionadas não só para o tratamento de metahemoglobinemia, mas também sendo introduzidas no tratamento de diversas outras condições (AUERBACH et al., 2010; GINIMUGE; JYOTHI, 2010; JENA; CHAINY, 2008).

Alguns medicamentos ou doenças podem afetar o nível de metahemoglobina (MetHb) em células. Nitrito, ácido ascórbico, azul de metileno e outros produtos químicos com alto potencial oxidativo ou redutor são capazes de alterar o ponto de equilíbrio hemoglobina-metahemoglobina (CAMERON, 1971). O AM possui a capacidade de corar tecidos e células nervosas em animais vivos (WILSON, 1910). Foi proposto que essas células nervosas absorvessem o AM, mas somente quando são expostas ao ar que ficaram visivelmente coradas de azul, isto ocorre devido a consequência da redução do azul de metileno à “leucobase”. A reação depende do fato de que a propriedade corante do AM se deve à presença de um grupo de átomos com afinidade pelo hidrogênio. A introdução de hidrogênio neste radical insaturado resulta numa perda de cor; mas esta leucocominação pode ser oxidada e retornar a cor original. Esta propriedade de redução do azul de metileno à sua forma , serve como mecanismo responsável pela capacidade do azul de metileno de converter metahemoglobina em hemoglobina (EHRlich, 1885).

O azul de metileno catalisa a redução da metahemoglobina em hemoglobina (BODANSKY E GUTMANN, 1947; BODANSKY, 1950; SMITH, 2019). Duas vias são responsáveis por reverter a metahemoglobina em hemoglobina e por manter a concentração normal de metahemoglobina em torno de 1%. Estas são a metahemoglobina redutase dependente de nicotina adenina dinucleotídeo (NADH) e a metahemoglobina redutase dependente de nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) . A metahemoglobina redutase dependente de NADH é normalmente responsável por 95% da conversão, enquanto a metahemoglobina redutase dependente de NADPH é responsável pelos outros 5%. A metahemoglobina redutase dependente de NADPH exige um transportador de elétrons como a flavina ou um cofator como o azul de metileno. O azul de metileno ativa o sistema enzimático alternativo (NADPH metahemoglobina redutase), reduz o azul de metileno a azul de leucometileno, que possui a capacidade de transformar a metahemoglobina em hemoglobina (HAYMOND, 2005). O azul de metileno, portanto, atua como um doador de elétrons para o mecanismo de redução da metahemoglobina (Figura 3). Estima-se que o AM possa acelerar a taxa de conversão de metahemoglobina em hemoglobina aproximadamente seis vezes em humanos, sendo administrado via intravenosa com doses variando de acordo com as concentrações de metahemoglobina que os pacientes apresentam (BRADBERRY, 2003).

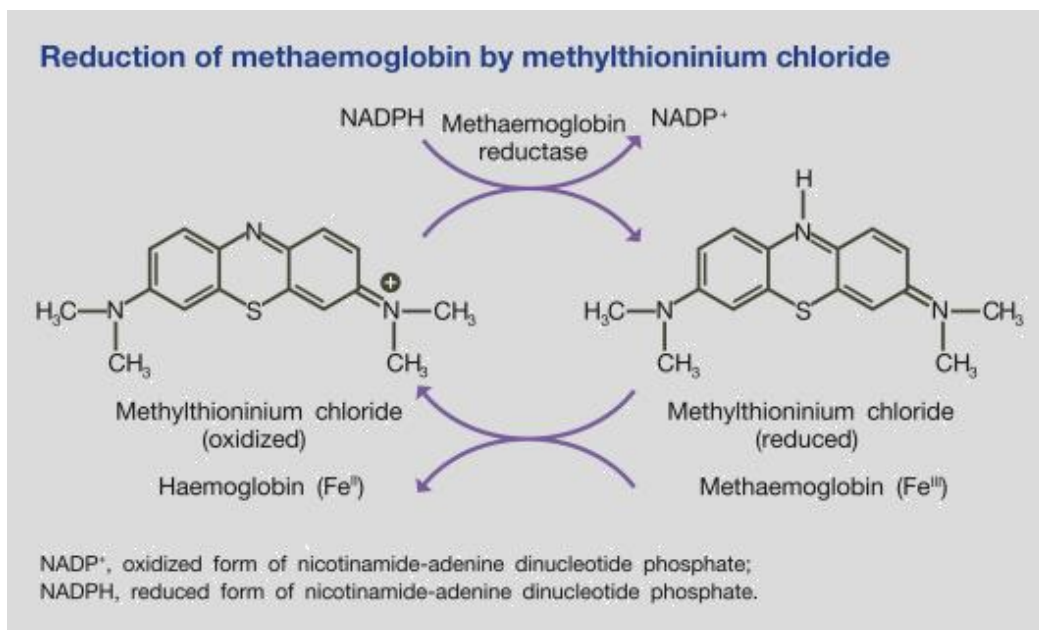


Figura 3 - A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno (Adaptado de Bradberry, 2016).

Na aquicultura, o azul de metileno é frequentemente utilizado como desinfetante, uma vez que o composto iônico resultante na solução aquosa pode competir com sistemas enzimáticos microbianos por íons de hidrogênio, inativando as enzimas e levando à perda de viabilidade dos microrganismos (TIEMAN E GOODWIN, 2001; ŠAFAŘÍK, 2002). Além disso, é frequentemente aplicado na aquicultura ornamental como antifúngico e antiparasitário (LEVINE E MEADE, 1976; PICON- CAMACHO et al. 2012) e é considerado seguro para uso com ovas de peixe e alevinos para a prevenção de infecções fúngicas e bacterianas (GRATZEK, 1981).

Alguns autores tiveram êxito ao utilizar AM como uma forma de tratamento para a intoxicação por nitrito na aquicultura. Bortz (1976) demonstrou sucesso ao administrar azul de metileno por via injeção intraperitoneal. Da mesma forma, Wedemeyer e Yasutake (1978) alcançaram resultados positivos ao testar a eficácia do tratamento com 1 mg/L de AM na água, visando a redução da toxicidade aguda por nitrito em alevinos de truta steelhead (*Salmo gairdneri*) e concluíram que o azul de metileno reduziu significativamente os níveis de metahemoglobina em poucas horas. Vršková e Knotek (2008) também obtiveram êxito ao utilizar banhos de imersão contendo azul de metileno, com concentrações de 2 mg/L para larvas e 4 mg/L para adultos em anfíbios.

Entretanto, nenhuma dessas vias de administração são práticas viáveis do ponto de vista comercial. O tratamento via injeção é uma técnica trabalhosa, onerosa, que necessita de sedação e é considerado inviável para produções em larga escala, sendo justificável apenas para peixes de alto valor zootécnico, quando a terapia prévia via oral não apresentar bons resultados (TAVARES, 2012). Métodos não injetáveis, como a imersão, permitem a medicação de milhares de peixes em um período reduzido.

(KLESZIUS et al., 2004), mas para serem efetivos devem ser realizados por períodos prolongados e são necessárias quantidades maiores de medicamentos para alcançar o efeito desejado (VANDERBERG, 2004; RODGERS, 2009; NOGA, 2010). A administração oral é o método mais viável para a administração de medicamentos aos peixes: não há manipulação, não causa estresse, além da administração ser fácil e adequada para grandes quantidades de peixes (VANDERBERG, 2004).

#### **4.6. Modelo Biológico Utilizado**

A tilápia-do-Nilo é uma espécie de peixe pertencente à família Cichlidae (Ordem Perciformes), originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África. Inicialmente, foram disseminadas nas regiões tropicais e subtropicais (CNAANI et al. 2008) e, posteriormente, introduzidas em diferentes continentes (FITZSIMMONS, 2000), sendo hoje um dos principais peixes comerciais cultivados e comercializados em todo o mundo (CHARO-KARISA, 2024), sendo encontrada em mais de 120 países (FAO, 2020). Tal fato é justificado devido a características fisiológicas, biologia reprodutiva, plasticidade genética, desenvolvimento de linhagens domesticadas, facilidade de comercialização, rápido crescimento e resistência às doenças (FITZSIMMONS, 2000).

Devido à diminuição da pesca de captura global, a aquicultura da tilápia cresceu muito nas últimas duas décadas (FAO, 2020). As capturas de tilápia e outros ciclídeos na natureza representaram aproximadamente 0,9 milhões de toneladas por ano em 2020, enquanto 6,1 milhões de toneladas foram provenientes da aquicultura intensiva (FAO, 2022). Os principais produtores de tilápia incluem China, Indonésia, Egito, Brasil, Filipinas, Bangladesh, Vietnã, Tailândia e Colômbia (CHARO-KARISA, 2024).

A intensificação dos processos produtivos trata-se a uma das principais mudanças ocorridas na aquicultura brasileira e essa intensificação se dá principalmente devido ao maior emprego tecnológico. Apesar desta tendência estar ocorrendo no setor de uma forma geral, ela é verificada intensamente na cadeia produtiva da tilápia. A tilápia-do-Nilo é uma espécie exótica produzida em diversos países e possui pacote tecnológico bastante avançado (PEDROZA FILHO et al, 2015). As tilápias e os peixes nativos são responsáveis por contribuição direta com o crescimento da piscicultura brasileira. Entre 2008 e 2018, a produção de peixes cresceu 58,3% e a produção de tilápias individualmente cresceu 113,4% (FAO FishStat 2021; FAOSTAT 2021). As tilápias são encontradas em todas as regiões do país, entretanto, a sua produção varia entre as regiões. O Sul lidera a produção de tilápias, apresentando 43,4% da produção nacional, seguido pelo Sudeste, com aproximadamente 27% da produção, o Nordeste produz 18% do total de tilápias do país, e por último, o Centro-Oeste representando 11,5% do cultivo (PEIXEBR, 2022).

Entre as espécies de peixes mais cultivadas, a tilápia é a que apresenta maior capacidade de adaptação a grande diversidade de condições ambientais, apresentando resistência a altas temperaturas, baixa concentração de oxigênio dissolvido, alta concentração de amônia na água, possuem boas características organolépticas e rusticidade, assim sendo, são características que permitem sua utilização em ensaios científicos devido às facilidades de manejo e de reprodução ao longo do ano (EL-SAYED, 2006). A tilápia é mais tolerantes à toxicidade do nitrito do que muitas espécies de água doce (POPMA E MASSER, 1999), além de serem mais tolerantes a hipóxia (MENGISTU et al., 2020), sendo essas características de extrema relevância para a sua escolha como modelo biológico utilizado deste estudo.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Instalações e Animais Experimentais

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Peixes, do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), localizado no município de Piracicaba - São Paulo, no período de 11/09/2023 até 25/09/2023. Todos os procedimentos experimentais realizados com os animais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Esalq/USP, protocolo número 2036290823.

O experimento foi conduzido e analisado em um delineamento inteiramente casualizado, com 2 tratamentos e cada tratamento teve uma réplica de aquário. Foram utilizados 15 peixes em cada aquário e 30 peixes em cada tratamento, totalizando 60 juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) pesando em média  $25\text{g} \pm 1,3$ , que foram acondicionados em aquários com de vidro (70 L) com entradas de água independentes e aeração forçada através de soprador radial e pedras porosas difusoras. A fonte de água era proveniente do sistema de abastecimento de água da ESALQ/USP, após processo de repouso por um período de 48 horas para a evaporação do cloro. Os aquários foram mantidos em um sistema aberto de circulação, com renovação frequente de água, possuindo fotoperíodo controlado (12 horas de claro e 12 horas de escuro).

Os parâmetros de qualidade da água foram determinados diariamente e mantiveram-se adequados durante todo o período experimental. Para avaliação da temperatura ( $T^\circ$ ) e do oxigênio dissolvido (OD) foi utilizado um oxímetro portátil: O OD foi mantido em  $6,81 \pm 0,27$  mg L e a  $T^\circ$  mantida em  $27,5^\circ\text{C} \pm 0,8$  com a utilização de um de termostato de 300W em cada aquário. Para a avaliação do pH foi utilizado um pHmetro de bancada e o pH foi mantido em  $6,98 \pm 0,10$ . Os teores de amônia foram determinados por teste colorimétrico com leitura realizada em espectrofotômetro e manteve-se em  $1,25 \pm 0,43$  mg/L.

### 5.2 Formulação e Confecção das Rações Experimentais

Foi formulada uma ração basal de acordo com as exigências nutricionais de juvenis de tilápia-do-Nilo com base no NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011), contendo 26% de proteína bruta e  $3200$  kcal  $\text{kg}^{-1}$  de energia digestível (Tabela 1).



Tabela 1 – Formulação das rações experimentais

Ingredientes	Inclusão %
Farelo de soja	50,01
Milho	39,68
Óleo de Soja	2,61
DL-Metionina	0,10
Premix mineral-vitamínico	1,00
Fosfato Bicálcico	4,75
Calcário Calcítico	1,85
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

Fonte: Própria autora.

Para a preparação da ração, todos os ingredientes foram peneirados, moídos, pesados, homogeneizados, umedecidos e extrudados (Figura 4). Por último, a ração extrudada foi acondicionada em bandejas em estufa de ventilação forçada a 65°C até secagem completa.

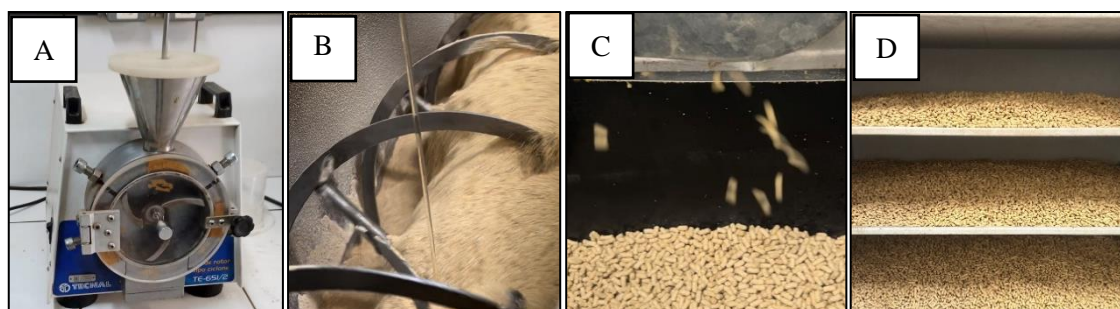


Figura 4 - Processos da produção da ração sendo (A) Moinho de ingredientes (B) Homogeneizador de ingredientes (C) Processo de extrusão da ração e (D) Ração sendo seca em estufa. (Fonte: Própria autora).

Após a secagem completa, a ração foi moída novamente e dividida em duas porções iguais, sendo que uma dessas porções recebeu a inclusão de 10g/kg de azul de metileno. Após este procedimento, essas duas porções foram homogeneizadas, umedecidas, peletizadas e secas em estufa de ventilação forçada (Figura 5). Em seguida, as rações foram guardadas em sacos plásticos e mantidas refrigeradas (4°C) até o momento de serem fornecidas aos peixes.

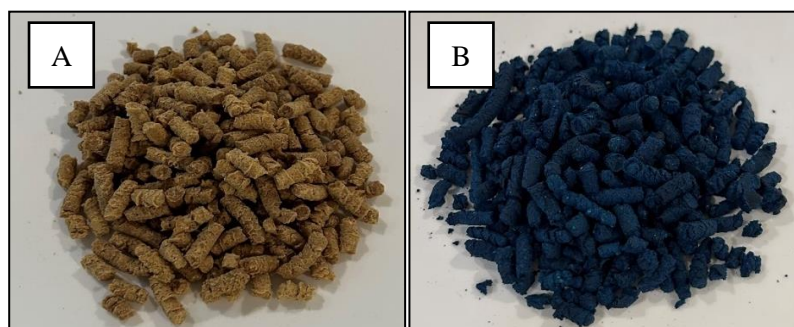


Figura 5 – Rações peletizadas sendo (A) Ração medicada com a inclusão de 10g/kg de Azul de Metileno e (B) Ração Controle. (Fonte: Própria autora).

### 5.3 Intoxicações agudas por nitrito

Os peixes foram aclimatados por sete dias, sendo alimentados durante esse período de forma *ad libitum* com ração basal não medicada. Após o período de aclimação, o grupo do tratamento com azul de metileno (AM) passou a receber a ração medicada e o grupo do tratamento controle (C) continuou recebendo a ração basal até o fim do experimento.

Após cinco dias da introdução da ração experimental, os animais foram expostos a doses subletais de nitrito durante 48 horas. Nas primeiras 24 horas, foi administrada uma dose de 20 mg/L de  $\text{NO}_2\text{-N}$ , entretanto, como os animais não demonstraram qualquer alteração de comportamento em resposta a essa exposição, a dose foi aumentada para 90 mg/L nas 24 horas subsequentes. Este aumento foi necessário para cumprir um dos objetivos do estudo, que era observar sinais clínicos específicos em resposta à intoxicação por nitrito. As intoxicações foram realizadas através da adição de nitrito de sódio na água em um reservatório de 1000 L, que era transferida para os aquários por uma bomba submersa conectada às entradas de água dos aquários. A intoxicação foi realizada dessa forma afim de garantir que todos os aquários experimentais recebessem a mesma concentração de nitrito. No último dia do experimento, foram amostrados aleatoriamente dez peixes de cada tratamento ( $n=10$ ) para as coletas de amostras biológicas.

### 5.4 Coletas de Biomarcadores

Os biomarcadores quantificados no experimento foram o sangue e os filamentos branquiais. Para a coleta de sangue, os peixes foram previamente anestesiados por imersão em uma solução com 1,5 mL/L de eugenol adequadamente contidos com um pano úmido sobre os olhos e as amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia caudal, utilizando seringas estéreis de 3 mL, agulhas descartáveis umedecidas internamente com o anticoagulante EDTA (Figura 6 A) e posteriormente o sangue foi acondicionado em microtubo de polipropileno (RANZANI-PAIVA, 2013) e imediatamente encaminhados para as análises. Após a coleta de sangue, os peixes retornaram para uma solução mais concentrada com 3 mL/L de eugenol para aprofundamento anestésico e eutanásia, logo após a eutanásia, foram seccionadas amostras da região central dos filamentos branquiais (Figura 6 B) e acondicionadas em tubos com solução de formalina para posterior confecção de lâminas histológicas (Figura 6 C).

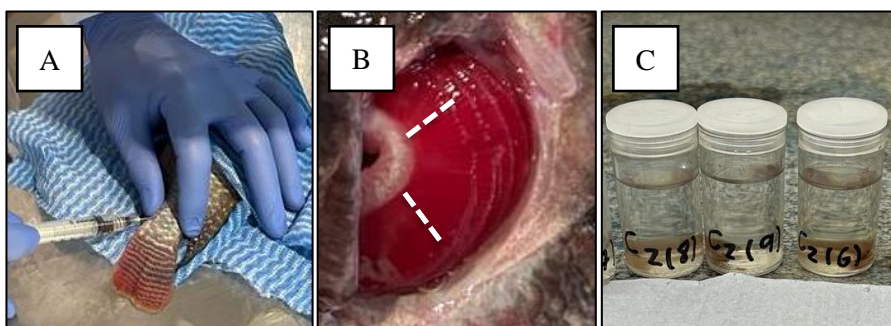


Figura 6 – Coleta de biomarcadores, sendo (A) Coleta de sangue via punção da veia caudal, (B) Local de secção dos filamentos branquiais e (C) Tubos com amostras de filamentos branquial (Fonte: Própria autora).

## 5.5 Análises Hematológicas

### 5.5.1 Perfil Hematológico

As análises foram realizadas em duplicata (N=10) e o perfil hematológico dos animais foi calculado através da determinação dos seguintes parâmetros: Concentração de hemoglobina (Hb) em amostras de sangue total pelo método colorimétrico de cianometahemoglobina utilizando kit comercial (Kit Labtest - Centerkit, SP, Brasil); Contagem total de eritrócitos determinada manualmente em Câmara de Neubauer e corado por solução Natt-Herrick (NATT & HERRICK, 1952) (Figura 7 A e B) e quantificados pela fórmula: Número de eritrócitos (Er) = [número de glóbulos contados × diluição (201) × altura entre lamínula e câmara (10) × número de quadrados contados (5)]; Hematócrito determinado pelo método padrão do microhematócrito, as mostras de sangue duplicadas foram carregadas em tubos capilares, submetidos a centrifugação a 11.000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos e medidas em um leitor microcapilar (GOLDENFARB et al., 1971) (Figura 7 C), Proteína plasmática lida por refratômetro de Brix com uma gota de plasma do capilar de microhematócrito, quebrando-o logo acima da camada de leucócitos após a leitura do hematócrito (HRUBEC E SMITH, 2010) e posteriormente foram calculados os índices hematimétricos derivados dos seus valores de acordo com a metodologia descrita por Wintrobe em 1934, sendo:

$$\text{Volume Corpuscular Médio} = \frac{\text{Hematócito} \times 10}{\text{Número de Eritrócitos} (\times 10\mu\text{L})} = \text{fl}$$

$$\text{Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)} = \frac{\text{Taxa de Hemoglobina} \times 10}{\text{Número de Eritrócitos} (\times 10\mu\text{L})} = \text{pg}$$

$$\text{Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina} \times 10}{\text{Hematócrito}} \text{ g dL}^{-1}$$

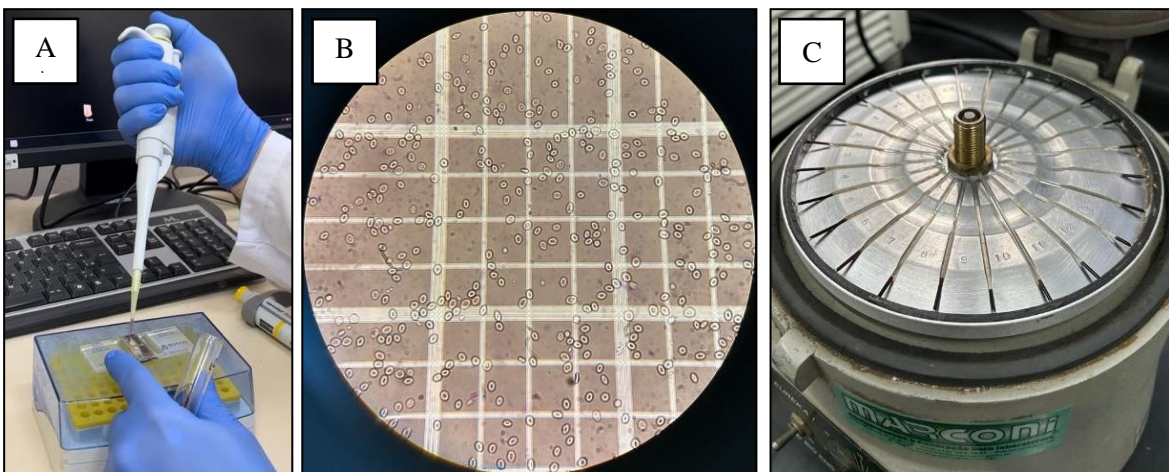


Figura 7 – Análises de Perfil Hematológico, sendo (A) Carregamento da Câmara de Neubauer com a amostra diluída de sangue com a solução de Natt-Herrick, (B) Grade de linhas perpendiculares do hemocitotômetro Neubauer para a contagem de eritrócitos vista pela lente do microscópio e (C) Tubos capilares após microcentrifugação para a determinação do valor do hematócrito (Fonte: Própria autora).

### 5.5.2 Metahemoglobina

As análises foram realizadas em duplicata (N=10). Amostras de 50 µL de sangue total foram adicionadas a 1250 µL da solução tampão fosfato diluída em um tubo de ensaio, seguido por uma agitação em vórtex por 30 segundos para promover a lise dos eritrócitos e oxigenação da hemoglobina. Após isso, o homogenato resultante foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL e centrifugado a 10000 RPM a 20 °C por 3 minutos. Após a centrifugação foi realizada uma leitura a um comprimento de onda de 633 nm no espectrofotômetro (Shimadzu). Em seguida, 1000 µL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta e a leitura inicial (A1) foi registrada. Posteriormente, 10 µL da solução de nitrito 5% foram adicionados ao sobrenadante, homogeneizado e incubado por 30 minutos. Após esse período, foi realizada uma segunda leitura (A2).

A concentração de hemoglobina foi determinada através do método colorimétrico por kit comercial (Kit Labtest - Centerkit, SP, Brasil) e foi utilizada a equação a seguir para determinar o valor da absorbância basal:

$$A_p = (\text{concentração de Hb em g/dL}) \times 11,6$$

E o percentual de Metahemoglobina (MetHb) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{MetHb} = \frac{A_1 - A_p}{A_2} \times 100$$

Posteriormente, com os dados da hemoglobina e da metahemoglobina, também foi calculada a concentração de metahemoglobina circulante pela seguinte fórmula:

$$\text{MetHb Circulante} = \text{Hb} \times \frac{\text{MetHb}}{100}$$

### 5.6 Análises Histológicas

Os fragmentos branquiais amostrados foram imediatamente fixados em solução de formalina tamponada a 10% por um período de 24 horas. Em seguida os materiais foram desidratados em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70-100%) e diafanizados em xilol. Três imersões de 2 horas em parafina antecederam a inclusão em bloco do mesmo material. Após a inclusão em parafina, foram realizados cortes longitudinais com 5 micrômetros de espessura, utilizando um micrótomo manual (Leica - RM 2145). Os cortes, uma vez transferidos para lâminas, foram desparafinizados e, posteriormente, corados com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (Brancoft, 2008). Após a preparação das lâminas histológicas, estas foram examinadas utilizando o microscópio Primostar 3 e fotografadas com a câmera digital colorida para microscópio Axiocam 208 color (Zeiss) (Figura 8), e posteriormente as lesões foram caracterizadas.

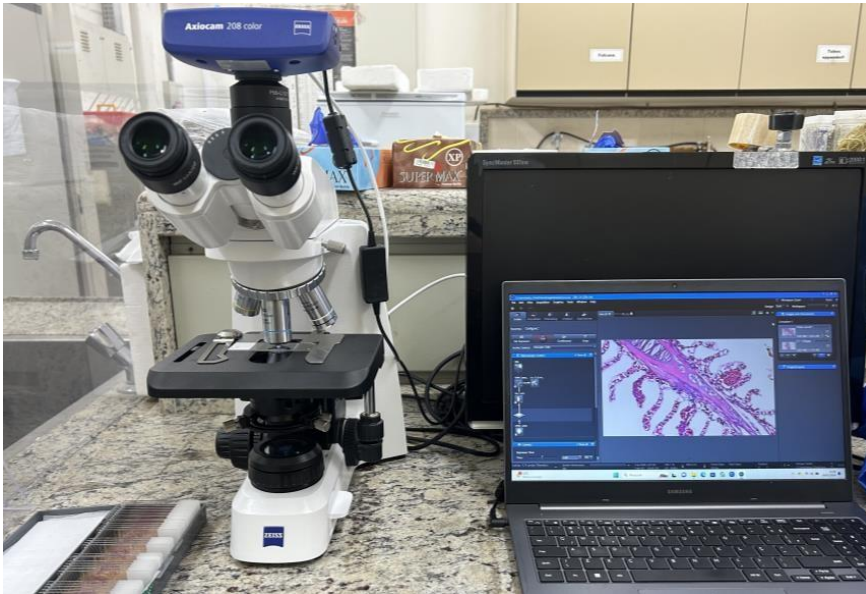


Figura 8 – Exame histológico das lâminas dos tecidos branquiais.

## 5.7 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos erros através do teste de Shapiro- Wilk e à verificação da homocedasticidade das variâncias pelo teste de Levene. As comparações das médias foram avaliadas por meio do teste t de Student ( $\alpha=0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software R Studio.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Sinais Clínicos de Hipóxia e Mortalidade

Após as primeiras 24 horas de intoxicação por nitrito (dose 20 mg/L) foram identificados dois óbitos no grupo controle (C). Os demais peixes, tanto do grupo controle, quanto do grupo medicado com azul de metileno (AM) não apresentaram alterações comportamentais, alimentando-se normalmente e sem sinais evidentes de hipóxia. A toxicidade do nitrito nos peixes pode variar consideravelmente, e há casos em que ocorre morte súbita, sem evidências de sinais clínicos anteriormente (SVOBODOVA et al., 2005).

Nas últimas 24h de intoxicação por nitrito (dose 90 mg/L) que antecederam a coleta, foram identificados mais três óbitos no grupo controle, além de ser possível observar sinais clínicos evidentes de um quadro de hipóxia em alguns dos peixes do mesmo grupo. Os peixes apresentaram-se no fundo do aquário, moribundos e com natação errática (Figura 9). Alguns autores relatam que peixes em condição de hipóxia não apresentam atividades a fim de escapar do ambiente hipóxico, e não sobem até a superfície da água para recorrer à respiração aérea, mas sim permanecem estáticos no fundo do tanque para economizar energia para enfrentar a hipóxia (ISRAELENSE E KIMMEL, 1996; WU, 2002; DOUXFILS et al. 2012). Ao mesmo período, os peixes do grupo medicado com azul de metileno mantiveram-se sem alterações comportamentais, sem sinais evidentes de hipóxia e não houve nenhum óbito.



Figura 9 – Peixes do tratamento controle que apresentaram sinais clínicos característicos de um quadro de hipóxia causado pela intoxicação por nitrito (Fonte: Própria autora).

Além dos sinais clínicos relatados acima, foram também observadas as colorações branquiais após a eutanásia dos peixes. Sendo possível observar brânquias normocoradas nos peixes do grupo medicado com azul de metileno e brânquias com coloração próxima ao marrom nos peixes do grupo controle (Figura 10). A oxidação da hemoglobina em metahemoglobina confere uma coloração marrom

ao sangue (SMITH E WILLIAMS, 1974; SCARANO et al., 1984; MASSER et al., 1999; NOGA 2010) e em consequência disso, peixes em quadros de intoxicação por nitrito geralmente apresentam também alteração na coloração das brânquias, que podem apresentar colorações próximas ao marrom (WEDEMEYER, 1996; NOVOTNY, 2021). Também foi possível observar após o óbito, que alguns peixes do grupo controle, apresentaram a boca bem aberta e os opérculos alargados, assim como os sinais de hipóxia relatados por Novotny em 2021.



Figura 10 – Coloração das brânquias dos peixes, sendo: Do lado esquerdo um peixe do tratamento medicado com azul de metileno e do lado direito um peixe do tratamento controle (Fonte: Própria autora).

## 6.2 Análises Hematológicas

Com a intensificação da produção de peixes, os problemas sanitários se tornaram cada vez mais frequentes, sendo necessário o monitoramento a saúde dos peixes nos sistemas de criação. Nesse contexto, a hematologia é uma ferramenta de fundamental importância para essa avaliação, permitindo ao pesquisador e ao produtor identificar as respostas dos peixes frente aos desafios (RANZANI- PAIVA, 2013). O diagnóstico por meio de análises hematológicas é especialmente importante porque pode fornecer uma avaliação confiável por meios não letais aos peixes (SATHEESHKUMAR et al., 2012). O sangue é biomarcador muito utilizado em pesquisas toxicológicas, atuando como indicador de alterações fisiopatológicas provenientes de circunstâncias estressantes em peixes (VÁZQUEZ E GUERRERO, 2007). O perfil hematológico dos peixes pode demonstrar seu estado fisiológico e de saúde, sendo muito utilizado para identificar ou avaliar o estado funcional causado por diferentes estressores (FAZIO, 2019). Esses índices têm sido empregados para monitorar efetivamente as

respostas dos peixes aos estressores e seu estado de saúde sob condições adversas (VÁZQUEZ E GUERRERO, 2007).

Os resultados para os dados hematológicos: hemoglobina (Hb), metahemoglobina (MetHb), metahemoglobina circulante (MetHbC)), eritrócitos (He), hematócrito (Htc), proteína total (Ptn), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos das tilápias alimentadas com as rações experimentais

Dados Hematológicos	Tratamentos		<i>p</i> -valor
	Azul de Metileno (AM)	Controle (C)	
Hb (g/dL)	3,95 ± 1,25	5,06 ± 1,04	0,009
MetHb (%)	57,97 ± 10,77	64,85 ± 9,12	0,046
MetHb Circ. (g/dL)	2,22 ± 0,68	3,25 ± 0,67	0,000
Er (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	1,29 ± 0,31	1,84 ± 0,82	0,017
Htc (%)	20,05 ± 5,03	19,83 ± 4,62	0,894
Ptn (g/dL)	4,37 ± 0,50	4,61 ± 0,53	0,204
VCM (fL)	165,71 ± 69,04	121,83 ± 77,92	0,041
HCM (pg)	32,62 ± 14,90	31,32 ± 15,91	0,783
CHCM (%)	20,63 ± 2,09	27,51 ± 3,39	0,063

Legenda: Hb - hemoglobina (g/dL); MetHb - Metahemoglobina (%); MetHb Circ. (g/dL) – Metahemoglobina circulante. Er - Eritrócitos (x 10<sup>6</sup> mm<sup>-3</sup>); Htc - hematócrito (%), Ptn (g/dL) – Proteína total, VCM - volume corpuscular médio (fL); HCM - hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM - concentração da hemoglobina corpuscular média (%). Os valores correspondem a média ± DP de cinco peixes de cada unidade experimental. (Fonte: Própria autora).

Houve diferenças entre os grupos Azul de Metileno (AM) e Controle (C) em diversos parâmetros hematológicos. A variável Hb ( $p = 0,009$ ) apresentou diferença nos níveis de hemoglobina entre os tratamentos, sendo que o tratamento controle apresentou uma média maior. A variável methb ( $p = 0,046$ ) também apresentou diferença nos níveis de metahemoglobina entre os tratamentos, tendo o tratamento controle apresentado níveis médios de metahemoglobina maiores. A variável methb circulante, calculada de acordo com os valores de hemoglobina multiplicados pelos valores de metahemoglobina, representando a quantidade de metahemoglobina circulante no sangue, foi a variável



que exibiu a maior diferença ( $p = 0.000$ ). Resultados significativos também foram observados nas variáveis Er ( $p = 0.017$ ) e VCM ( $p = 0.041$ ), sugerindo variações nas concentrações de eritrócitos e volume corpuscular médio. Por outro lado, as variáveis hct, ptn, HCM, e CHCM não apresentaram entre os tratamentos.

A intoxicação por nitrito nos peixes está associada à sua interação com a hemoglobina (ALATORRE-JÁCOME et al., 2011). Na corrente sanguínea, o nitrito é consumido em reações com hemoglobina (Hb) (JENSEN E ROHDE, 2010), que causam a oxidação do ferro, gerando metahemoglobina (MetHb) (KOSAKA E TYUMA, 1987; JENSEN, 2009), uma molécula incapaz de se ligar ao oxigênio e transportá-lo para os tecidos. Dessa forma, os peixes intoxicados por nitrito, consequentemente aumentam a formação de metahemoglobina e perdem a capacidade de transporte de oxigênio, resultando em um quadro de hipóxia tecidual e causando estresse (WOO E CHIU, 1997; MASSER et al., 1999, NOGA, 2010; NOVOTNY, 2021). Os peixes utilizam estratégias complexas de adaptação fisiológica para lidar com o estresse por hipóxia, passando por processos de modificações neurais, comportamentais e fisiológicas para a manutenção da homeostase (ABDEL-TAWWAB et al., 2019). Existe um padrão de respostas hematológicas frente a desafios respiratórios em peixes, incluindo hipóxia (HOUSTON et al. 1988; HOUSTON E MURAD, 1991, 1992; MURAD et al. 1990, 1993).

Alguns estudos demonstram aumento nas concentrações de Hb e Er como respostas hematológicas frente ao estresse por hipóxia (ABDEL-TAWWAB et al. 2014, 2015; WOOD et al. 2019; WU et al. 2020; NI et al. 2020). Esse aumento nas concentrações de Hb e Er contribui para a obtenção de  $O^2$  e aumenta a capacidade de transportá-lo no sangue (WOOD E PERRY, 1985; WELLS E BALDWIN, 2006). Sob estresse por hipóxia, peixes geralmente diminuem o consumo de  $O^2$ , desacelerando seus movimentos e melhorando a capacidade de transporte de  $O^2$  através do aumento dos valores de Er e Hb (COSSINS E CRAWFORD, 2005; ROESNER et al. 2006; XIA et al. 2016).

No presente estudo foram encontrados resultados semelhantes, pois foram observadas médias superiores na concentração de Hb ( $p = 0,009$ ) e Er ( $p = 0,017$ ) no sangue dos peixes do tratamento controle (C), sugerindo um mecanismo fisiológico de ação compensatória afim de tentar reduzir os efeitos da hipóxia causados pela concentração significativamente maior que apresentaram de MetHb ( $p = 0,046$ ) e MetHbC ( $p = 0$ ) no sangue. A apresentação clínica dos peixes moribundos no fundo do aquário, a fim de reduzir o consumo de  $O^2$  também corrobora com os resultados obtidos.

A liberação imediata de Er frente aos episódios de intoxicação aguda por nitrito ocorre pelo baço durante a hipóxia, resultando significativamente em uma maior densidade de glóbulos vermelhos circulando na corrente sanguínea, o que consequentemente aumenta a quantidade de Hb (WU et al., 2016; ABDEL-TAWWAB et al., 2019). A hipóxia é o principal estímulo da eritropoiese nos vertebrados e o baço

é considerado um dos principais locais hematopoiéticos dos teleósteos (FANGE, 1986). A liberação imediata de Er armazenados no baço pode aumentar as concentrações de Hb em até um terço. E a intensificação no processo de produção e maturação dos eritrócitos, complementada pela maior produção de células juvenis, aumentam o número relativo destas células juvenis circulantes. Estas células, que são capazes de síntese de hemoglobina, podem então alterar o perfil isomorfo global na estrutura ou nas características das células sanguíneas em resposta a esses processos (PEARSON E STEVENS, 1991). Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, sendo que o Volume Corpuscular Médio (VCM) foi significativamente menor ( $p = 0.041$ ) no grupo controle, sugerindo uma maior liberação de células jovens, causada pela intensificação na produção de Hb e Er no sangue, a fim de aumentar a oxigenação e tentar reduzir os efeitos deletérios da hipóxia.

A captação de  $O^2$  branquial não é limitante, dessa forma a taxa de entrega de  $O^2$  aos tecidos é uma função do produto do débito cardíaco e do transporte de  $O^2$  no sangue, condicionada pela afinidade da Hb- $O^2$  (HOUSTON E MURAD, 1991). Dessa forma, os resultados das alterações hematológicas apresentadas pelos peixes no estudo em questão, sugerem que os peixes do grupo controle (C) estavam enfrentando um maior desafio causado pela hipóxia, utilizando o mecanismo fisiológico de ação compensatória, tentando intensificar sua eritropoiese a fim de fornecer  $O^2$  aos tecidos. Os peixes do grupo medicado com azul de metileno (AM), embora tenham atingido níveis de MetHb altos, enfrentaram um menor desafio e conseguiram transportar  $O^2$  de forma mais eficiente, sugerindo que o azul de metileno em sua capacidade antioxidante tem o potencial de auxiliar o peixe compensar os efeitos deletérios causados pela intoxicação por nitrito.

### 6.3 Análises Histológicas

Alterações bioquímicas e fisiológicas nos organismos podem desencadear consequências histopatológicas, caracterizadas por lesões teciduais em órgãos específicos (HINTON E LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992). A intoxicação por poluentes aquáticos pode desencadear esse processo e a análise histológica de órgãos e células-alvo se torna uma ferramenta crucial para identificar os danos resultantes dessa exposição (CARDOSO et al. 1996; SCHWAIGER et al., 1997; CENGIZ et al. 2001). Em organismos aquáticos, as brânquias são importantes biomarcadores histopatológicos em estudos relacionados a contaminação por poluentes aquáticos, uma vez que estão em contato direto com agentestóxicos (BERNET et al., 1999).

As brânquias são órgãos importantes para os peixes, estando envolvidos diretamente em diversas funções vitais, tais como respiração, regulação osmótica, equilíbrio ácido-base, excreção de resíduos nitrogenados e as células que a constituem respondem direta ou indiretamente aos fatores ambientais e a alterações internas do organismo (POLEKSIĆ & MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, 1994; LUPI et al., 2007).

A maior área superficial das brânquias está em contato direto com a água, tornando-as vulneráveis a substâncias tóxicas nos ambientes aquáticos (ROMANO E ZENG, 2009; LUZIO et al. 2013; LIN et al., 2018), sendo consideradas órgãos-alvo bem conhecidos nos peixes e os primeiras a reagir, podendo alterar sua morfologia padrão frente às condições ambientais desfavoráveis (BENLI et al., 2008), destacando entre essas condições, a presença de substâncias tóxicas, como os compostos nitrogenados e seus potenciais efeitos deletérios (ROMANO E ZENG, 2009). O nitrito é um composto nitrogenado transmitido pela água, que entra diretamente no corpo do peixe através do trocador do trocador cloreto/bicarbonato no epitélio branquial (LIN et al., 2018) e pode causar danos teciduais às brânquias (DUTRA et al., 2017).

As fotomicrografias das brânquias dos peixes do estudo em questão nos permitiram observar diferenças entre os dois tratamentos com relação a arquitetura de seus filamentos branquiais e podem ser mais bem visualizadas nas figuras abaixo (Figura 11 e Figura 12).

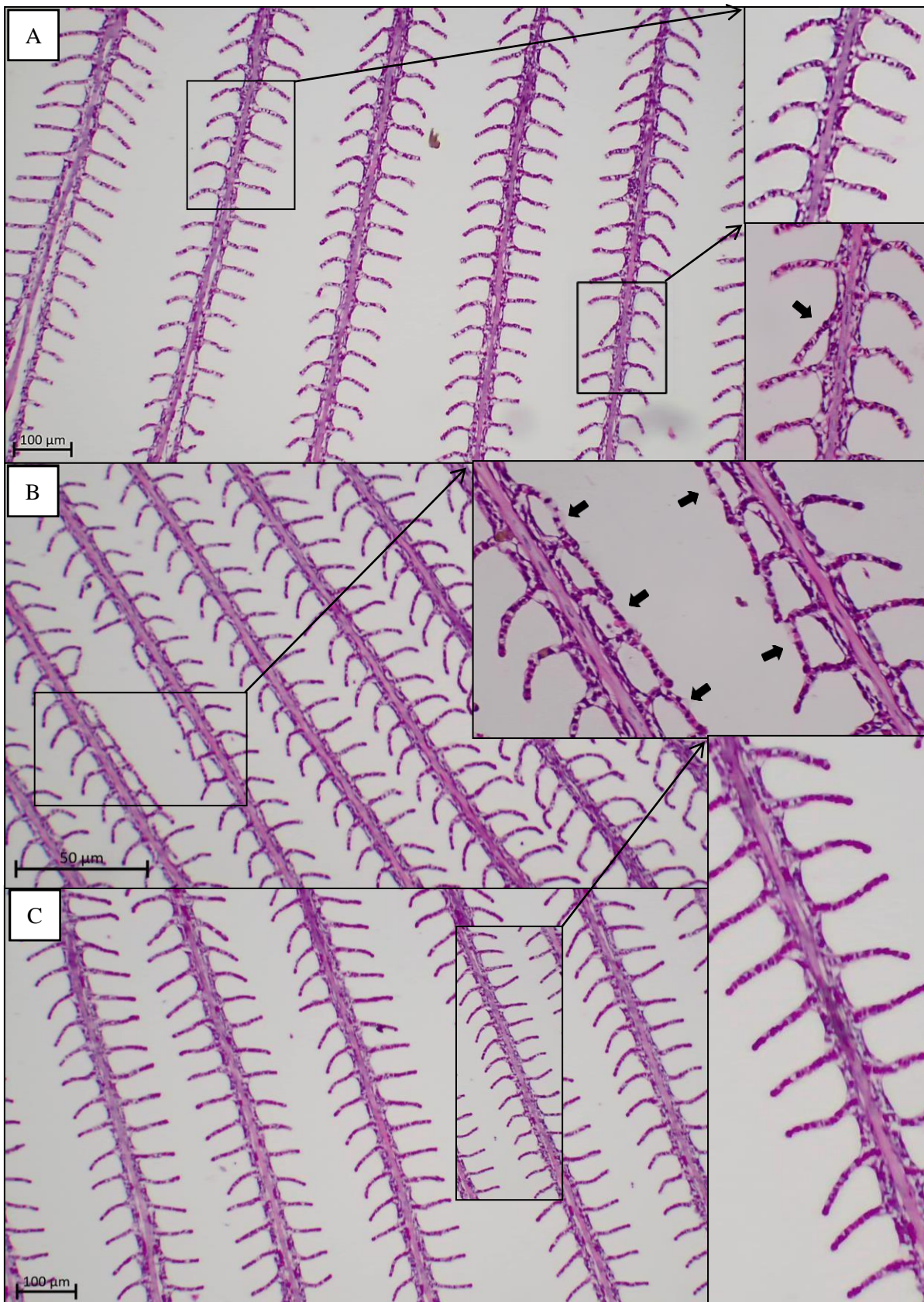


Figura 11 - Fotomicrografia das brânquias dos peixes do grupo medicado com azul de metileno (AM). Sendo (A) Filamentos branquiais com arquitetura preservada e sem alterações severas, apresentando apenas uma lamela tortuosa em ponto focal; (B) Filamentos preservados e sem alterações severas, apresentando apenas lamelas branquiais tortuosas em pontos multifocais e (C) Filamentos preservados e sem alterações.

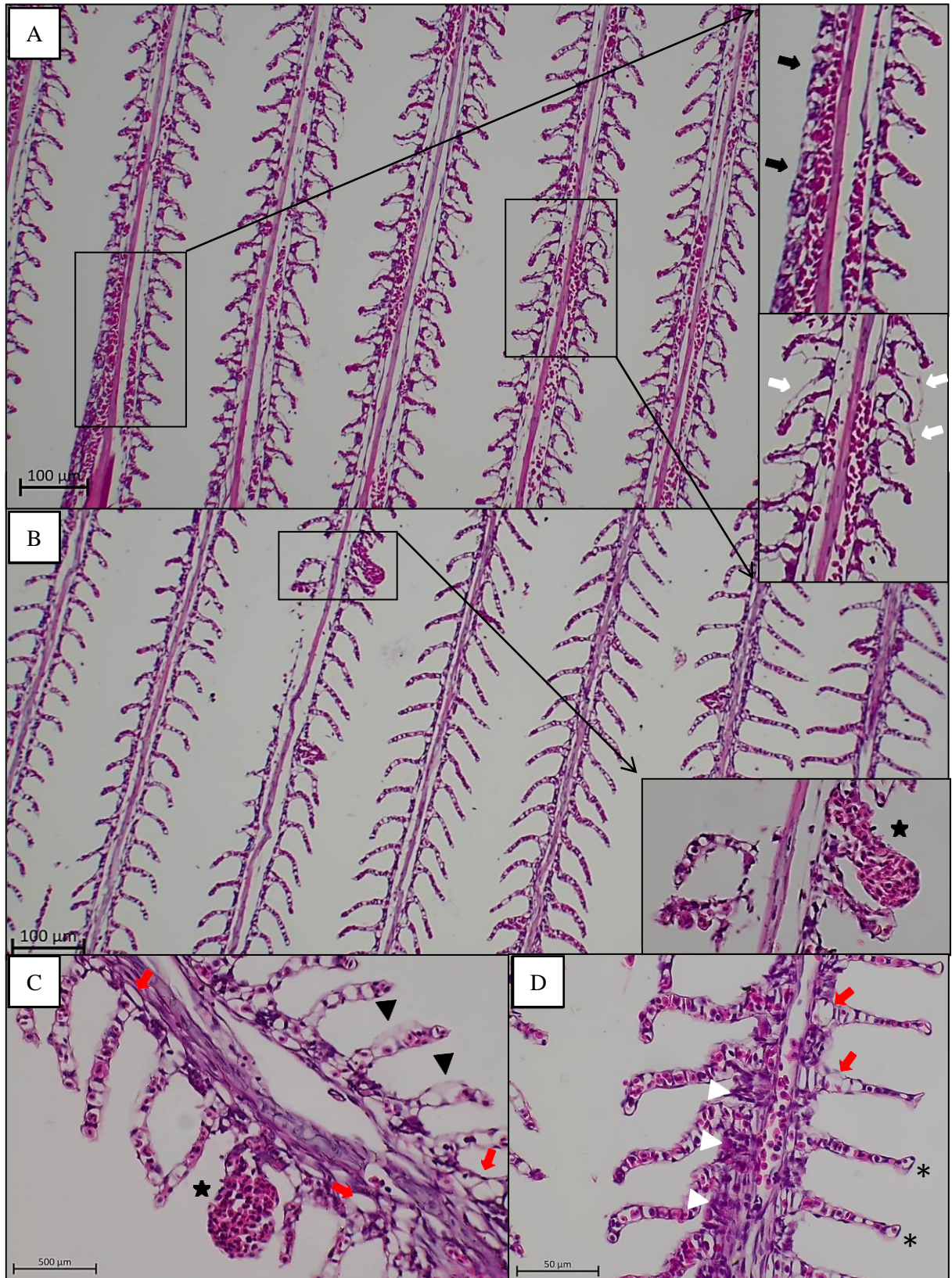


Figura 12 - Fotomicrografia de brânquias dos peixes do grupo controle (C). Sendo que em todas as imagens é possível observar perdas da estrutura lamelar padrão (A) Região de fusão lamelar (setas pretas) e Deslocamento epitelial (setas brancas); (B) Aneurisma lamelar (estrela preta); (C) Aneurisma lamelar (estrela preta) e Edema lamelar (triângulos pretos); Congestão capilar (setas vermelhas) e (D) Espessamento epitelial, hiperplasia celular e proliferação de células mucosas (triângulos brancos); Congestão capilar (setas vermelhas) e Hipertrofia leve (asterisco preto).

Nos peixes do grupo medicado com azul de metileno (AM) as estruturas e os filamentos branquiais estavam bem conformados e com sua arquitetura padrão preservada, apresentando apenas lesões de grau leve como tortuosidades em lamelas (Figura 11). Já nos peixes do grupo controle (C) foi possível visualizar perdas severas na estrutura lamelar padrão, além de diversos tipos de lesões estruturais nos tecidos branquiais como fusão lamelar, deslocamento epitelial, aneurisma lamelar, edema lamelar, congestão capilar, espessamento epitelial, proliferação de células mucosas, além de hiperplasia e hipertrofia celular (Figura 12).

Diversos autores relatam danos histológicos branquiais causados por nitrito semelhantes aos que foram encontrados no estudo em questão (MICHAEL et al., 1987; SVOBODOVA et al., 2005; ROMANO E ZENG 2009; ROUMIEH et.al, 2012; WUERTZ et al. 2013; SAOUD, 2014; SILVA, 2018; LIU, 2022). Estas alterações morfológicas nas estruturas estão ligadas à fisiologia dos peixes e resultam em disfunção osmorregulatória das brânquias (DEANE & WOO, 2007; PARK et al. 2007; ROMANO & ZENG 2009; SAOUD et al. 2014). Os danos histológicos causados às superfícies branquiais pelo nitrito são atribuídos ao alto acúmulo nas brânquias, irritação devido à elevadasecreção mucosa, aumento do volume de ventilação e diminuição da eficiência de captação de oxigênio (BASKAR, 2014).

Alterações como espessamento epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais e fusão de lamelas são exemplos de mecanismos de defesa das brânquias (VELASCO-SANTAMARIAE CRUZ-CASALLAS, 2008), pois estes resultam no aumento da área epitelial, aumentando a distância entre o ambiente aquático contaminado e a corrente sanguínea, atuando como barreira à entrada de contaminantes e reduzindo a absorção destes no sangue (MALLAT, 1985; ALBASSAM et al., 1987; POLEKSIC E MITROVIC TUTUNDZIC, 1994; FERNANDES E MAZON, 2003; ABDEL-MONEIM et al., 2012, ROUMIEH et al., 2012). Já o aneurisma lamelar possivelmente ocorreu devido a danos nas células pilares, comprometendo a integridade vascular com liberação de grande quantidade de sangue forçando a saída do epitélio (ROUMIEH et al., 2012).

A análise histológica das brânquias permite avaliar de forma direta a relação do peixe com o ambiente aquático e a homeostase entre eles, sendo esperado que a área lamelar seja maior quando há condições favoráveis para o que o animal tenha maior interação com o ambiente e o oposto ocorre quando o animal está num ambiente mais desafiador, com presença de agentes irritantes ou tóxicos (FALKENBERG et al. 2003), destacando entre esses agentes o nitrito, que é um composto nitrogenado tóxico transmitido pela água, que entra diretamente no corpo do peixe através do epitélio branquial (LIN et al., 2018).

Todos os danos branquiais que foram encontrados no grupo controle (C) do estudo em questão corroboram com as lesões descritas na literatura, entretanto sugere-se que os peixes do grupo controle estavam enfrentando um ambiente bastante desafiador causado pela intoxicação por nitrito, reagindo frente a esse ambiente com os mecanismos de defesa demonstrados nas alterações branquiais encontradas. Os peixes do grupo medicado com azul de metileno (AM) conseguiram debelar melhor

esse ambiente desafiador causado pela toxicidade do nitrito, por isso não foi possível observar lesões significativas em seus filamentos branquiais, que se mantiveram com a arquitetura padrão preservada.

## 7. CONCLUSÕES

O azul de metileno administrado por via oral possui a capacidade de auxiliar o peixe a compensar os efeitos causados pela intoxicação por nitrito. Os resultados das análises hematológicas e histológicas sugeriram que os peixes do grupo controle (C) enfrentaram um maior desafio causado pela toxicidade do nitrito e os peixes do grupo medicado com azul de metileno (AM) conseguiram debelar melhor esse ambiente desafiador. Embora estes resultados sugiram que o azul de metileno administrado por via oral pode ser uma alternativa potencial para mitigar os impactos negativos da intoxicação por nitrito, mais pesquisas são necessárias para determinar a dosagem e o período de administração ideais.





## REFERÊNCIAS

Agriculture Organization of The United Nations. Fisheries Department. **The state of world fisheries and aquaculture.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996.

Agriculture Organization of The United Nations. Fisheries Department. **The State of World Fisheries and Aquaculture, 2000.** Food & Agriculture Org., 2000.

Abdel-Moneim, Ashraf M.; Al-Kahtani, Mohamed A.; Elmenshawy, Omar M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 1028-1035, 2012.

Abdel-Tawwab, M., Monier, M. N., Hoseinifar, S. H., & Faggio, C. Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. **Fish physiology and biochemistry**, 45, 997-1013, 2019.

Affonso, E. G., Polez, V. L. P., Corrêa, C. F., Mazon, A. D. F., Araujo, M. R. R., Moraes, G., & Rantin, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 133(3), 375-382, 2002.

Alatorre-Jácome, O., García-Trejo, F., Rico-García, E., & Soto-Zarazúa, G. M. Aquaculture water quality for small-scale producers. **Aquaculture and the Environment-A Shared Destiny**, 125-140, 2011.

Albassam, M.; Moore, J.; Sharma, A. Ultrastructural and clinicopathological studies on the toxicity of cationic acrylamide-based flocculant to rainbow trout. **Veterinary pathology**, v. 24, n. 1, p. 34-43, 1987.

Alda, M., Mckinnon, M., Blagdon, R., Garnham, J., Maclellan, S., O'donovan, C., & Macqueen, G. Methylene blue treatment for residual symptoms of bipolar disorder: randomised crossover study. **The British Journal of Psychiatry**, v. 210, n. 1, p. 54-60, 2017.

Allison, Edward H. *Aquicultura, pesca, pobreza e segurança alimentar.* 2011.

Alvarado, N. E., Quesada, I., Hylland, K., Marigómez, I., & Soto, M. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 64-77, 2006.

Aggergaard, S.; Jensen, Frank Bo. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 59, n. 1, p. 13-27, 2001.

Arana, Luis Alejandro Vinatea. **Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas.** Ed. da UFSC, 2010.

Arillo, A., Gaino, E., Margiocco, C., Mensi, P., & Schenone, G. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: Liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. **Environmental Research**, v. 34, n. 1, p. 135-154, 1984.

Auerbach, S. S., Bristol, D. W., Peckham, J. C., Travlos, G. S., Hébert, C. D., & Chhabra, R. S. Toxicity and carcinogenicity studies of methylene blue trihydrate in F344N rats and B6C3F1 mice. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 1, p. 169-177, 2010.

Avnimelech, Y., Weber, B., Hefner, B., Milstein, A., & Zorn, M. J. A. R. Studies in circulated fish ponds: organic matter recycling and nitrogen transformation. **Aquaculture Research**, v. 17, n. 4, p. 231-242, 1986.

Barcia, Juan José. The Giemsa stain: its history and applications. **International journal of surgical pathology**, v. 15, n. 3, p. 292-296, 2007.

Bartlett, F.; Neumann, D. Sensitivity of brown trout alevins (*Salmo trutta* L.) to nitrite at different chloride concentrations. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 60, p. 340-346, 1998. Bradberry, S. (2016). Methemoglobinemia. *Medicina*, 44(2), 91-92.

Barroso, R. M., Muñoz, A. E. P., Tahim, E. F., Webber, D. C., Albuquerque Filho, A. D. C., Pedroza Filho, M. X., & Hein, G. **Diagnóstico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil**. 2018.

Baskar, Thangam. Impact of nitrite toxicity on histopathological profile to freshwater fish, *Cirrhinus Mrigala*. **The International Journal of Engineering and Science**, v. 3, n. 4, p. 42-47, 2014.

Bradberry, Sally M. Occupational methaemoglobinemia: mechanisms of production, features, diagnosis and management including the use of methylene blue. **Toxicological reviews**, v. 22, p. 13-27, 2003.

Bancroft, John D.; Gamble, Marilyn (Ed.). **Theory and practice of histological techniques**. Elsevier health sciences, 2008.

Béné, Christophe et al. Contribuição das pescas e da aquicultura para a segurança alimentar e a redução da pobreza: avaliando as evidências atuais. **Desenvolvimento mundial**, v. 79, p. 177-196, 2016.

Benli, Aysel Çağlan Karasu; Köksal, Gülten; Özkul, Ayhan. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1355-1358, 2008.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

Bowser, Paul R. **Brown blood disease (Methemoglobinemia) of fishes**. US Fish and Wildlife Service, 1984. Boyd, C. E. **Water quality in warmwater fish ponds**. 1979.

Boyd, C. E. **Water quality management for pond fish culture**. Elsevier Scientific Publishing Co., 1982.

Boyd, C. E.; Tucker, C. S. **Pond aquaculture water quality management**. Springer Science & Business Media, 2012.

Burrell, Paul C.; Phalen, Carol M.; Hovanec, Timothy A. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5791- 5800, 2001.

Cameron, James N. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 40, n. 3, p. 743-749, 1971.

Campbell, Eric L.; Colgan, Sean P. Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 2, p. 106-120, 2019.

Carbajal-Hernández, J. J., Sánchez-Fernández, L. P., Villa-Vargas, L. A., Carrasco-Ochoa, J. A., & Martínez-Trinidad, J. F. Water quality assessment in shrimp culture using an analytical hierarchical process. **Ecological indicators**, v. 29, p. 148-158, 2013.

Cardoso, E. L., Chiarini-Garcia, H., Ferreira, R. M. A., & Poli, C. R. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. **Journal of Fish Biology**, v. 49, n. 5, p. 778-787, 1996.

Cengiz, E. I.; Ünlü, E.; Balci, K. The histopathological effects of Thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 36, n. 1, p. 75-85, 2001.

Cerozi, Bruno; Fitzsimmons, Kevin. Use of *Bacillus* spp. to enhance phosphorus availability and serve as a plant growth promoter in aquaponics systems. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 277-282, 2016.

Charo-Karisa, H. Tilapia. In: **Encyclopedia of Meat Sciences (Third Edition)**. Páginas 29-39, 2024.

Cheng, C. H., Su, Y. L., Ma, H. L., Deng, Y. Q., Feng, J., Chen, X. L., ... & Guo, Z. X. Effect of nitrite exposure on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mud crab (*Scylla paramamosain*). **Chemosphere**, v. 239, p. 124668, 2020.

Cheng, S.-Y.; Chen, J.-C. Accumulation of nitrite in the tissues of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient nitrite after different time periods. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 39, p. 183-192, 2000.

Chui, J. S. W., Poon, W. T., Chan, K. C., Chan, A. Y. W., & Buckley, T. A. Nitrite-induced methaemoglobinaemia—etiology, diagnosis and treatment. **Anaesthesia**, v. 60, n. 5, p. 496-500, 2005.

Cnaani, A., Lee, B. Y., Zilberman, N., Ozouf-Costaz, C., Hulata, G., Ron, M., ... & Kocher, T. D. Genetics of sex determination in tilapiine species. **Sexual development**, v. 2, n. 1, p. 43- 54, 2008.

- Cossins, A. R., & Crawford, D. L. Fish as models for environmental genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 4, p. 324-333, 2005.
- Costa, L. D. F., Miranda-Filho, K. C., Severo, M. P., & Sampaio, L. A. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. **Aquaculture**, v. 285, n. 1-4, p. 270-272, 2008.
- Deane, Eddie E.; Woo, Norman Ys. Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*. **Aquatic toxicology**, v. 82, n. 2, p. 85-93, 2007.
- Del Punta, Karina; Charreau, Eduardo H.; Pignataro, Omar P. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5337-5343, 1996.
- Delaforge, M., Piffeteau, A., Boucher, J. L., & Viger, A. Nitric oxide formation during the cytochrome P-450-dependent reductive metabolism of 18-nitro-oxyandrostenedione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 2, p. 634-640, 1995.
- Douxflis, J., Deprez, M., Mandiki, S. N. M., Milla, S., Henrotte, E., Mathieu, C., ... & Kestemont, P. Physiological and proteomic responses to single and repeated hypoxia in juvenile Eurasian perch under domestication—clues to physiological acclimation and humoral immune modulations. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1112-1122, 2012.
- Dutra, F. M., Rönnau, M., Sponchiado, D., Forneck, S. C., Freire, C. A., & Ballester, E. L. C. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. **Aquatic Toxicology**, v. 187, p. 115-123, 2017.
- Ebeling, James M.; Timmons, Michael B. **Recirculating aquaculture**. Ithaca, NY, USA: Cayuga Aqua Ventures, 2010.
- Ehrlich, Paul. **Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie**. A. Hirschwald, 1885.
- El-Sayed, A. F. M. Current state and future potential. In: **Tilapia culture**. Wallingford UK: CABI Publishing, p. 1-24. 2006.
- Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M., & Makela, S. K. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. **Clinical biochemistry**, v.31, n. 4, p. 195-220, 1998.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Brill, G. C., & Klesius, P. H. Un-ionized ammonia exposure in Nile tilapia: toxicity, stress response, and susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. **North American Journal of Aquaculture**, v. 68, n. 1, p. 23-33, 2006.
- Falkenberg, M. De B.; Santos, Ri Dos; Simões, Cláudia Maria Oliveira. Introdução à análise fitoquímica. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 229-245, 2003.

- FAO, Food. Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture 2020: Sustainability in action. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 1-244, 2020.
- FAO FishStat. Dataset: global aquaculture production (online query). In: *Glob. Aquac. Prod.* 1950–2019, 2021.
- FAOSTAT. Food and agricultural organization of the United Nations corporate statistical database, 2021.
- Fänge, Ragnar. Physiology of haemopoiesis. In: **Fish physiology: recent advances**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 1-23. 1986.
- Fazio, Francesco. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. **Aquaculture**, v.500, p. 237-242, 2019.
- Fernandes, M.N., Mazon, A.F., Val, A.L., Kapoor, B.G. Environmental pollution and fish gill morphology. **Fish adaptation**, p. 203-231, 2003.
- Fitzsimmons, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. In: **Internacional Symposium On Tilapia Aquaculture**. 2000. p. 3-8.
- Gao, X. Q., Fei, F., Huo, H. H., Huang, B., Meng, X. S., Zhang, T., & Liu, B. L. Impact of nitrite exposure on plasma biochemical parameters and immune-related responses in *Takifugu rubripes*. **Aquatic Toxicology**, v. 218, p. 105362, 2020.
- Gao, X. Q., Fei, F., Huo, H. H., Huang, B., Meng, X. S., Zhang, T., ... & Liu, B. L. Exposure to nitrite alters thyroid hormone levels and morphology in *Takifugu rubripes*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 225, p. 108578, 2019.
- Ginimuge, Prashant R.; Jyothi, SD21547182. Methylene blue: revisited. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 517-520, 2010.
- Gimbo, R. Y., Saita, M. V., Gonçalves, A. F. N., & Takahashi, L. S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, p. 350-357, 2008.
- Goldenfarb, P. B. Reproducibility in the Hematology Laboratory: The Microhematocrit Determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35–39, 1 jul. 1971.
- Gladwin, M. T., Shelhamer, J. H., Schechter, A. N., Pease-Fye, M. E., Waclawiw, M. A., Panza, J. A., ... & Cannon III, R. O. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11482-11487, 2000.
- Gratzek, John B. An overview of ornamental fish diseases and therapy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, n. 6, p. 345-366, 1981.

Groff, Joseph M.; Zinkl, Joseph G. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish: common carp and goldfish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 2, n. 3, p. 741-776, 1999.

Gupta, Modadugu V. **Contribution of aquaculture to global food security**. 2018.

Hargreaves, John A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 166, n. 3-4, p. 181-212, 1998.

Haymond, Shannon et al. Laboratory assessment of oxygenation in methemoglobinemia. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 434-444, 2005.

Heath, Alan G. **Water pollution and fish physiology**. CRC press, 2018.

Hegazi, Mona M. et al. Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain. **Aquaculture**, v. 299, n. 1-4, p. 149-156, 2010.

Hilmy, A. M.; El-Domiaty, N. A.; Wershana, K. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. **Comparative Biochemistry and physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 247-253, 1987.

Hinton, D. E.; Lauren, D. L. Integrative histopathological approaches to detecting effects. **Biol. Ind. StressFish**, v. 17, p. 51-66, 1990.

Hinton, D. E. Et Al. Histopathological biomarkers In: Huggett, RJ, Kimerle, RA, Mehrle, PM, Bergman, HL (Eds.), Biomarkers: Biochemical, **Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. 1992.

Houston, Arthur H.; MURAD, Ajmal. Erythrodynamic in fish: recovery of the goldfish *Carassius auratus* from acute anemia. **Canadian journal of zoology**, v. 73, n. 3, p. 411-418, 1995.

Hrubec, T. C.; Smith, S. A. Hematology of fishes. Em: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 994–1003.

Huey, D. W.; Beitinger, T. L.; Wooten, M. C. Nitrite-induced methemoglobin formation and recovery in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) at three acclimation temperatures. **Bull. Environ. Contam. Toxicol. (United States)**, v. 32, n. 6, 1984.

Hussain, M. G. Farming of tilapia: Breeding plans, mass seed production and aquaculture techniques. **Habiba Akter Hussain**, v. 55, p. 149, 2004.

Israeli, Dorith; Kimmel, Eitan. Monitoring the behavior of hypoxia-stressed *Carassius auratus* using computer vision. **Aquacultural engineering**, v. 15, n. 6, p. 423-440, 1996.

Jena, Srikanta; Chainy, G. B. Effect of methylene blue on oxidative stress and antioxidant defence parameters of rat hepatic and renal tissues. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 52, n. 3, p. 293-296, 2008.

Jensen, Frank B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 135, n. 1, p. 9-24, 2003.

Jensen, F. B. Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals. **Nitrogen Metabolism and Excretion. CRC Press, Boca Raton**, v. 289303, 1995.

Khadka, Yagya Rath. Hemoglobin: A General Review. **Cognition**, v. 3, n. 1, p. 111-118, 2021.

Klesius, Phillip H.; Evans, Joyce J.; Shoemaker, Craig A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal health research reviews**, v. 5, n. 2, p. 305-311, 2004.

Kristiansen, J. E. Dyes, antipsychotic drugs, and antimicrobial activity. Fragments of a development, with special reference to the influence of Paul Ehrlich. **Danish medical bulletin**, v. 36, n. 2, p. 178-185, 1989.

Kosaka, Hiroaki; TYUMA, Itiro. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. **Environmental Health Perspectives**, v. 73, p. 147-151, 1987.

Kozák, P.; Máchová, J.; Polícar, T. The effect of chloride content in water on the toxicity of sodium nitrite for spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus* Raf.). **Bull. Fr. Pêche Piscic**, v. 376, n. 377, p. 705-714, 2005.

Kroupova, H., Stejskal, V., Kouril, J., Machova, J., Piackova, V., & Zuskova, E. A wide difference in susceptibility to nitrite between Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) and largemouth bass (*Micropterus salmoides* Lac.). **Aquaculture International**, v. 21, p. 961-967, 2013.

Kroupova, H., Machova, J., & Svobodova, Z. Nitrite influence on fish: a review. **Veterinarni medicina-praha**, v. 50, n. 11, p. 461, 2005.

Kiese, Manfred. Methemoglobinemia: a comprehensive treatise. 2019.

Kubitza, Fernando. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Ed. do Autor, 2000.

Lauer, T., Preik, M., Rassaf, T., Strauer, B. E., Deussen, A., Feelisch, M., & Kelm, M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 22, p. 12814-12819, 2001.

Levine, Gerald; Meade, Thomas L. The effects of disease treatment on nitrification in closed system aquaculture. In: **Proceedings of the annual meeting-World Mariculture Society**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 1976. p. 483-493.



Lewis Jr, William M.; Morris, Donald P. Toxicity of nitrite to fish: a review. **Transactions of the American fisheries society**, v. 115, n. 2, p. 183-195, 1986.

Lima, Luciene C.; Holanda, Eve D.; Ribeiro, Lincoln P. Doença do sangue marrom em Tilápias *Oreochromis sp* produzidas em recirculação. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2008.

Lin, Y., Miao, L. H., Pan, W. J., Huang, X., Dengu, J. M., Zhang, W. X., ... & Xi, B. W. Effect of nitrite exposure on the antioxidant enzymes and glutathione system in the liver of bighead carp, *Aristichthys nobilis*. **Fish & shellfish immunology**, v. 76, p. 126-132, 2018.

Liu, H. J., Dong, M., Jiang, W. D., Wu, P., Liu, Y., Jin, X. W., ... & Zhou, X. Q. Acute nitrite exposure-induced oxidative damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis caused gill tissue damage of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Relieved by dietary protein. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 243, p. 113994, 2022.

Losordo, T. M.; Timmons, M. B. An introduction to water reuse systems. **Developments in aquaculture and fisheries science**, v. 27, p. 1-7, 1994. Lovell, T. Nutrition and Feeding of Fish. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers. 1989.

Love, D. C., Fry, J. P., Genello, L., Hill, E. S., Frederick, J. A., Li, X., & Semmens, K. An international survey of aquaponics practitioners. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e102662, 2014.

Lupi, C., Nhacarini, N. I., Mazon, A. F., & Rigolinsá, O. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Rev. Hispeci & Lema**, v. 3, p. 1-6, 2007.

Luzio, A., Monteiro, S. M., Fontáinhas-Fernandes, A. A., Pinto-Carnide, O., Matos, M., & Coimbra, A. M. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. **Aquatic toxicology**, v. 128, p. 183-189, 2013.

Tavares, Guilherme C.; Leal, Carlos Ag; Figueiredo, Henrique. CP. 6. Antibioticoterapia em peixes. **PROJETO DE EDUCAÇÃO CONTINUADA**, v. 156, p. 65, 2012.

Tavares-Dias, Marcos; Mariano, W. Dos S. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. **Aspectos Biológicos, Fisiológicos e Sanitários de Organismos Aquáticos**, 2015.

Martins, C. I. M., Eding, E. H., Schneider, O., Rasmussen, R., Olesen, B., Plesner, L., & Verreth, J. A. J. Recirculation aquaculture systems in Europe. **CONSENSUS. Oostende, Belgium, Consensus working Group, European Aquaculture Society**, v. 31, 2005.

Martins, Catarina Im; Eding, Ep H.; Verreth, Johan AJ. The effect of recirculating aquaculture systems on the concentrations of heavy metals in culture water and tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1001-1005, 2011.

Meade, James W. Allowable ammonia for fish culture. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 47, n. 3, p. 135- 145, 1985.

Meade, Thomas L.; Perrone, Stephen J. Effect of chloride ion concentration and pH on the transport of nitrite across the gill epithelia of coho salmon. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 42, n. 2, p. 71-72, 1980.

Masser, Michael P.; Rakocy, James; Losordo, Thomas M. **Recirculating aquaculture tank production systems**. Southern regional aquaculture center, 2000.

Maetz, Jean. Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 262, n. 842, p. 209-249, 1971.

Miao, L. H., Lin, Y., Pan, W. J., Huang, X., Ge, X. P., Zhou, Q. L., ... & Ji, K. Comparative transcriptome analysis reveals the gene expression profiling in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in response to acute nitrite toxicity. **Fish & shellfish immunology**, v. 79, p. 244-255, 2018.

Miranda-Filho, K. C., Pinho, G. L. L., Wasielesky Jr, W., & Bianchini, A. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 3, p. 377-382, 2009.

Miranda-Filho, K. C.; Costa, L. D. F. Deleterious effects of ammonia and nitrite to fish and crustaceans, chapter 26. **M. TAVARES-DIAS and WS MARIANO, orgs. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. São Carlos: Pedro & João Editores**, v. 2, p. 545-578, 2015.

Mohanty, B. P., Mahanty, A., Ganguly, S., Mitra, T., Karunakaran, D., & Anandan, R. Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security. **Food chemistry**, v. 293, p. 561-570, 2019.

Molleda, Mercedes Isla; Thorarensen, Helgi; Johannsson, Ragnar. Water quality in recirculating aquaculture systems for arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) culture. **División de Cultivos Marinos, Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP) 5ta Ave y**, v. 246, p. 73-75, 2007.

Munns, Rana; Termaat, Annie. Whole-plant responses to salinity. **Functional Plant Biology**, v. 13, n. 1, p.143-160, 1986.

Negarchi, S., Mehrjerdi, M. Z., Nabieian, S., Khoshakhlagh, R., & Granados, D. M. Impact of provincial water management on environment and social welfare in West of Zayanderood Basin, Iran. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 8, n. 1, p. 41-50, 2018.

National Research Council - NRC. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

Natt, Michael P.; Herrick, Chester A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952.

Negarchi, S., Mehrjerdi, M. Z., Nabieian, S., Khoshakhlagh, R., & Granados, D. M. Impact of provincial water management on environment and social welfare in West of Zayanderood Basin, Iran. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 8, n. 1, p. 41-50, 2018.

Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Bu, Y., Ren, Y., ... & Ding, H. The physiological performance and immune responses of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) to stocking density and hypoxia stress. **Fish & shellfish immunology**, v. 36, n. 2, p. 325-335, 2014.

Noga, E. J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. John Wiley & Sons, 2010.

NOVOTNY, Ladislav. Respiratory Tract disorders in fishes. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 24, n. 2, p. 267-292, 2021.

OKE, O. L. Nitrite toxicity to plants. **Nature**, v. 212, n. 5061, p. 528-528, 1966.

Park, I. S., Lee, J., Hur, J. W., Song, Y. C., Na, H. C., & Noh, C. H. Acute toxicity and sublethal effects of nitrite on selected hematological parameters and tissues in dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*. **Journal of the world aquaculture society**, v. 38, n. 2, p. 188-199, 2007.

Pearson, M. P.; Stevens, E. D. Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 9, p. 39-50, 1991.

Pedroza-Filho, M. X., Valadao-Flores, R. M., Rodrigues, A. O., & Rezende, F. P. Análise comparativa de resultados econômicos dos polos piscicultores no segundo trimestre de 2015. **Palmas: EMBRAPA Pesca e Aquicultura**, 2015.

Peixe, B. R. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuario de Piscicultura Brasileira. Edição**, 2022.

Perrone, Stephen J.; Meade, Thomas L. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 34, n. 4, p. 486-492, 1977.

Picon-Camacho, S. M., Marcos-Lopez, M., Bron, J. E., & Shinn, A. P. An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. **Parasitology**, v. 139, n. 2, p. 149-190, 2012.

Pillay, T. V. R. **Aquaculture: principles and practices**. fishing news books, 1990.

Pinheiro, M. F. Análise da capacidade adsorptiva de palha de café arábica utilizando corante azul de metileno. **Braz. J. de Desenvolver**, 6(1), 2861-2868, 2020.

Poleksić, V.; Mitrović-Tutundžić, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**, p. 339-352, 1994.

Popma, T.; Masser, M. **Tilapia life history and biology**. 1999.

Randall, David J.; Tsui, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine pollution bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 17-23, 2002.

Ranzani-Paiva, M. J. (2013). **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013.

Rodgers, C. J., & Furones, M. D. Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. **Options Méditerranéennes**, v. 86, p. 41-59, 2009.

Roesner, A., Hankeln, T., & Burmester, T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of experimental biology**, v. 209, n. 11, p. 2129-2137, 2006.

Romano, Nicholas; Zeng, Chaoshu. Subchronic exposure to nitrite, potassium and their combination on survival, growth, total haemocyte count and gill structure of juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 4, p. 1287-1295, 2009.

ROUMIEH, Rana et al. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskål 1775). **Aquaculture Research**, v. 44, n. 11, p. 1777-1790, 2013.

Šafařík, I.; Šafaříková, M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. **Water research**, v. 36, n. 1, p. 196-200, 2002.

Sánchez, O. I. A., & Matsumoto, T. Hydrodynamic characterization and performance evaluation of an aerobic three-phase airlift fluidized bed reactor in a recirculation aquaculture system for Nile tilapia production. **Aquacultural Engineering**, v. 47, p. 16-26, 2012.

Saoud, P., Naamani, S., Ghanawi, J., & Nasser, N. Effects of acute and chronic nitrite exposure on rabbitfish *Siganus rivulatus* growth, hematological parameters, and gill histology. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 5, 2014.

Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D., Khan, A. B., & Jeevanantham, K. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, p. 275-281, 2012.

Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., & Mandelkow, E. Lest we forget you - methylene blue. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 12, p. 2325. e7-2325. e16, 2011.

Silva, M.J.S. Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. **Science of the Total Environment**, v. 616, p. 1566-1575, 2018.

Svobodová, Z., Máchová, J., Drastichová, J., Groch, L., Lusková, V., Poleszczuk, G., ... & Kroupová, H. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 12, p. 1177-1184, 2005.

Svobodova, Z., Machova, J., Poleszczuk, G., Hůda, J., Hamáčková, J., & Kroupova, H. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. **Acta Veterinaria Brno**, v. 74, n. 1, p. 129-137, 2005.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., & Triebkorn, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.

Tieman, Darlene M.; Goodwin, Andrew E. Treatments for ich infestations in channel catfish evaluated under static and flow-through water conditions. **North American journal of aquaculture**, v. 63, n. 4, p. 293- 299, 2001.

Timmons, M. B. et al. Recirculating aquaculture systems. 2002.

Tomasso, J. R.; Simco, Bill A.; Davis, Kenneth B. Chloride inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 36, n. 9, p. 1141-1144, 1979.

Tomasso, J. R. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. **Reviews in Fisheries Science**, v. 2, n. 4, p. 291-314, 1994.

Thornton, Kent W.; Kimmel, Bruce L.; Payne, Forrest E. **Reservoir limnology: ecological perspectives**. John Wiley & Sons, 1991.

Tucker, Sraig S.; Hargreaves, John A. 10 Pond water quality. In: **Developments in Aquaculture and Fisheries Science**. Elsevier, p. 215-278, 2004.

Ueda, I. K., Egami, M. I., Sasso, W. D. S., & Matushima, E. R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei): part II. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 273-277, 2001.

Veras, G. C., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., Rosa, P. V., Leon, J. A. S., & Salaro, A. L. Fotoperíodo sobre parâmetros fisiológicos relacionados ao estresse em alevinos de tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1434-1440, 2013.

Vázquez, G. Rey; Guerrero, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and cell**, v. 39, n. 3, p. 151-160, 2007.

Van Breemen, N.; Van Dijk, H. F. G. Ecosystem effects of atmospheric deposition of nitrogen in the Netherlands. **Environmental pollution**, v. 54, n. 3-4, p. 249-274, 1988.

Vandenberg, Grant W. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality?. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 301-304, 2004.

Vennerstrom, J. L., Makler, M. T., Angerhofer, C. K., & Williams, J. A. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2671-2677, 1995.

Vršková, D., & Knotek, Z. Otravy obojživelníku. In: Svobodová Z (ed.) **Veterinární toxikologie v klinické praxi**, pp. 193–195, 2008.

Wedemeyer, Gary. **Physiology of fish in intensive culture systems**. Springer Science & Business Media, 1996.

Wedemeyer, Gary A.; YASUTAKE, W. T. Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 35, n. 6, p. 822-827, 1978.

Williams, E. M.; Eddy, F. B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 156, p. 867-872, 1986.

Wells, Rufus Mg; Baldwin, John. Plasma lactate and glucose flushes following burst swimming in silver trevally (*Pseudocaranx dentex*: Carangidae) support the “releaser” hypothesis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 143, n. 3, p. 347-352, 2006.

Wilson, J. Gordon. Intra vitam staining with methylene blue. **The Anatomical Record**, v. 4, n. 7, p. 267-277, 1910.

Wintrobe, Maxwell M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia haematologica**, v. 51, n. 32, p. 32-49, 1934.

Woo, N. Y. S.; Chiu, S. F. Metabolic and osmoregulatory responses of the sea bass *Lateolabrax japonicus* to nitrite exposure. **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, v. 12, n. 3, p. 257-264, 1997.

Wood, Andrew T. et al. Hypoxia during incubation does not affect aerobic performance or haematology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) when re-exposed in later life. **Conservation Physiology**, v. 7, n. 1, p. e088, 2019.

Wood, C. M.; Perry, S. F. Respiratory, circulatory, and metabolic adjustments to exercise in fish. In: **Circulation, Respiration, and Metabolism: Current Comparative Approaches**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985. p. 2-22.

Wu ZhiHao, W. Z., You Feng, Y. F., Wen AiYun, W. A., Ma DeYou, M. D., & Zhang PeiJun, Z. P. Physiological and morphological effects of severe hypoxia, hypoxia and hyperoxia in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 1, p. 219-227, 2016.

Wu, C. B., Zheng, G. D., Zhao, X. Y., Zhou, S., & Zou, S. M. Hypoxia tolerance in a selectively bred F4 population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) under hypoxic stress. **Aquaculture**, v. 518, p. 734484, 2020.

Wu, Rudolf S.S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. **Marine pollution bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 35-45, 2002.

Xia, M., Chao, Y., Jia, J., Li, C., Kong, Q., Zhao, Y., ... & Qi, D. Changes of hemoglobin expression in response to hypoxia in a Tibetan schizothoracine fish, *Schizopygopsis pylzovi*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 186, p. 1033-1043, 2016.

Yanbo, W., Wenju, Z., Weifen, L., & Zirong, X. Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 4.