



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



ESTUDOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS DO ESTRESSE
DE MANEJO DO PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*)

MICHELE FAGUNDES
Médica Veterinária

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CAMPUS JABOTICABAL

ESTUDOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS DO ESTRESSE
DE MANEJO DO PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*)

Michele Fagundes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AQUICULTURA, Área de Concentração em Aquicultura em Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2009

*A sabedoria do homem está dentro dele mesmo e
caminha lado a lado com a simplicidade.*

*A meus pais **Volmecir e Marinês**, por todo incentivo e apoio. Por estarem sempre dispostos a escutar, aconselhar e ajudar. Vocês são mais que especiais, são exemplo de caráter, honestidade, simplicidade e amor. Obrigado pela torcida e confiança e por me mostrarem a cada dia que a força está dentro de nós. Que Deus sempre iluminando vocês. Amo vocês.*

*Aos meus irmãos **Maiquel e Aniele**, pelo companheirismo e carinho. Obrigado por estarem sempre presentes na minha vida. Amo vocês.*

*Ao **Evandro Soares Guimarães**, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando. Obrigado pelo companheirismo, amizade, amor e compreensão. Te amo!*

*Ao **João Gabriel**, luz da minha vida, obrigada pelo sorriso sincero e ingênuo e pelo olhar carinhoso de todas as manhãs. Te amo filho!*

]

Ofereço e dedico

Homenagem

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

À você Beth, meu muito obrigado, pela oportunidade de trabalhar ao teu lado e de crescer não só profissionalmente, mas também como pessoa. Agradeço pela preocupação e compreensão durante todo este tempo. Por todo tempo dedicado, por cada sorriso e palavra de conforto, pelo simples fato de fazer parte da minha vida. Muito Obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por olhar pro mim nesta e em todas as minhas caminhadas.

À Damares Roviero, pela ajuda e colaboração durante as coletas e análises. E por toda atenção, preocupação e zelo.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos, agradeço pelo incentivo e pelo apoio. Como você mesmo diz: “Meus alunos vão embora, mas eu nunca consigo abandoná-los”. Obrigado por ter me encaminhado profissionalmente e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos amigos Leo Takahashi e Leonardo Barcellos pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores, funcionários e amigos do CAUNESP pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, pela convivência e aprendizado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes pela amizade, pela ajuda e pelas brincadeiras é claro!

Aos vizinhos e amigos queridos, Caroline, Mariana, Líliana, Líia, Fernando, Samuel e Túlio, pelo carinho, companhia, e pelas muitas risadas, vocês moram no meu coração.

Aos membros da Comissão Examinadora do Exame Geral de Qualificação, Fabiana Pilarski e Leonardo Susumo Takahashi, pela presença e sugestões. Muito Obrigada.

Aos membros da banca Comissão Examinadora meu muito obrigado pela presença e pelas sugestões.

A cada pessoa que passou nesta minha caminhada deixo meus agradecimentos e a certeza de que seria pouco dizer apenas obrigado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO GERAL	11
GENERAL ABSTRACT	13
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	
1. Panorama da aquicultura e produção de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>).....	16
2. O manejo da aquicultura e seus efeitos na fisiologia dos peixes.....	18
2.1. Mecanismo de estresse em peixes.....	18
2.2. Práticas da criação que causam estresse em peixes.....	19
2.2.1. Transporte de peixes vivos.....	20
2.2.2. Importância do fotoperíodo na criação de peixes.....	21
2.2.3. Uso de anestésico para redução de estresse em peixes.....	23
OBJETIVO GERAL	26
Objetivo específico.....	26
Bibliografia.....	27
CAPÍTULO II – Perfil circadianas das concentrações de cortisol e glicose no sangue de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>)	
Resumo.....	40
<i>Abstract</i>	41
Introdução.....	42
Objetivo.....	45
Material e Método.....	46
Amostragem e métodos de análise.....	46
Delineamento experimental e análise estatística.....	47
Resultados.....	48

Discussão.....	50
Conclusão.....	52
Bibliografia.....	53

CAPÍTULO III – Respostas fisiológicas de estresse no transporte de pintado
(Pseudoplatystoma corruscans)

Resumo.....	57
<i>Abstract</i>	58
Introdução.....	59
Objetivo.....	61
Material e Método.....	62
Amostragem e métodos de análise.....	62
Delineamento experimental e análise estatística.....	63
Resultados.....	64
Discussão.....	76
Conclusão.....	79
Bibliografia.....	80

CAPÍTULO IV – Fotoperíodo e sua importância na fisiologia do pintado
(Pseudoplatystoma corruscans)

Resumo.....	86
<i>Abstract</i>	87
Introdução.....	88
Objetivo.....	91
Material e Método.....	92
Amostragem e métodos de análise.....	92
Delineamento experimental e análise estatística.....	93
Resultados.....	94
Discussão.....	102
Conclusão.....	105
Bibliografia.....	106

CAPÍTULO V – Uso de anestésico determinação de concentrações apropriadas para anestesia cirúrgica no pintado
(Pseudoplatystoma corruscans)

Resumo.....	111
<i>Abstract</i>	112
Introdução.....	113
Objetivo.....	118
Material e Método.....	119
Amostragem e métodos de análise.....	120
Delineamento experimental e análise estatística.....	120
Resultados.....	121
Discussão.....	129
Conclusão.....	132
Bibliografia.....	133

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO V

Figura 1: Estágios de anestesia e recuperação.	117
Figura 2: Tempos de indução e recuperação de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L.	127
Figura 3: Tempos de indução e recuperação do pintados anestesiados com 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L.	127
Figura 4: Tempos de indução e recuperação do pintados anestesiados com eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L.	128

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
CAPÍTULO II	
Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados em diferentes tempos de amostragem durante 24 horas. Valores são médias \pm EPM (n=6).	48
Figura 2: Glicemia (mg/dL) de pintados em diferentes tempos de amostragem durante 24 horas. Valores são médias \pm EPM (n=12).	49
CAPÍTULO III	
Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=5).	64
Figura 2: Glicose plasmática (mg/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).	65
Figura 3: Cloreto sérico (mEq/L) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).	66
Figura 4: Osmolaridade sérica (mmol/kg) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9).	67
Figura 5: Proteína total sérica (g/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).	68
Figura 6: Colesterol sérico (mg/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).	69
Figura 7: Triglicerídeos séricos (mg/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte,	70

24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).

Figura 8: Lipídeo total muscular (%) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan). 71

Figura 9: Hematócrito (%) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan). 72

Figura 10: Número células vermelhas ($10^6/\text{mm}^3$) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan). 73

Figura 11: Volume corpuscular médio (μ^3) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan). 74

Figura 12: Hemoglobina (g/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan). 75

CAPÍTULO IV

Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição a diferentes luninosidades (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=5). 94

Figura 2: Glicose plasmática (mg/dL) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). 95

Figura 3: Cloreto sérico (mEq/L) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois).. Valores são médias \pm DP (n=6). 96

Figura 4: Osmolaridade sérica (mmol/kg) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). 97

Figura 5: Hematócrito (%) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Tukey). 98

Figura 6: Número de células vermelhas ($10^6/\text{mm}^3$) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Tukey). 99

Figura 7: Volume corpuscular médio (μ^3) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Tukey). * e ** indicam diferença significativa em relação à testemunha a 5 e 1 %, respectivamente. 100

Figura 8: Hemoglobina (g/dL) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Tukey). 101

CAPÍTULO V

Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25; 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %). 121

Figura 2: Glicose plasmática (mg/dL) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %). 122

Figura 3: Hematócrito (%) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 123

0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %).

Figura 4: Número de células vermelhas ($10^6/\text{mm}^3$) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %). 124

Figura 5: Volume corpuscular médio (μ^3) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %). 125

Figura 6: Hemoglobina (g/dL) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %). 126

Resumo geral

O número de espécies cultivadas no Brasil vem aumentando, surgindo a necessidade de um melhor conhecimento da fisiologia e das técnicas de produção, incluindo o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil circadiano do cortisol e da glicose do pintado sem a presença de agente estressor e respostas fisiológicas de estresse (níveis sanguíneos de cortisol e glicose, glicogênio hepático e muscular, níveis plasmáticos de cloreto e osmolaridade e hematócrito, número e volume das células vermelhas sanguíneas e hemoglobina) em indivíduos juvenis quando submetidos a diferentes tipos de agentes estressores comuns no manejo da criação (transporte de 12 horas, exposição à luz e escuro por 24 horas e exposição a três anestésicos, benzocaína, fenoxietanol e óleo de cravo). Não foram observadas diferenças estatísticas no perfil circadiano dos indicadores analisados, mas os valores de cortisol tinham variação de perfil no período diurno e noturno, com picos na instalação em condição de escuro e de claridade. A glicemia não mostrou correlação com o perfil do cortisol, mantendo valores mais constantes no período noturno. No experimento de transporte, os níveis de cortisol mostraram aumento após o transporte acompanhado por uma queda progressiva, vindo a alcançar valores inferiores ao do controle 48, 72 e 96 horas após a operação. A glicose se elevou após transporte retornando aos valores basais em 72 horas. Os níveis de lipídeo muscular aumentaram após o transporte retornando a valores próximos aos normais em 72 horas. O colesterol e a proteína aumentaram. O cloreto teve redução após transporte, bem como o hematócrito, número de células vermelhas e hemoglobina. Os dados metabólicos sugerem o uso de outra fonte que não a glicose para sustentar a demanda energética do estresse. No experimento em que os peixes foram submetidos a períodos de 24 horas de luz e escuridão, os níveis séricos de cortisol não diferiram estatisticamente, embora os valores dos animais submetidos à luz contínua fossem numericamente mais elevados em relação aos que permaneceram em total escuridão e ambos reduzidos em relação ao controle. A glicemia foi numericamente reduzida nos animais mantidos em ambiente escuro. Não houve alteração osmorregulatória e o hematócrito, número de células vermelhas e hemoglobina mostraram o mesmo perfil, tendendo ser maiores nos peixes expostos a luz constante. Por fim, os juvenis foram expostos a banhos de anestésicos (25, 50 e 75 mg/L de benzocaína, 0,2; 0,4; 0,8 mL/L de fenoxietanol e eugenol). Os níveis séricos de cortisol reduziram com o aumento da concentração de eugenol, sendo

observado o mesmo perfil com o feno-etanol e nenhuma diferença em relação a benzocaína. O mesmo perfil foi verificado com relação a glicose sanguínea sendo o valor mais baixo estatisticamente encontrado na dose mais baixa dos dois anestésicos. Comportamento semelhante de redução foi observado em relação à benzocaína e eugenol nos indicadores hematócrito, número de células vermelhas e hemoglobina. Nos três anestésicos, as menores concentrações promoveram os maiores tempos de indução anestésica. O tempo de recuperação não diferiu para benzocaína e 2-fenoxietanol, mas o eugenol apresentou maiores tempos nas concentrações mais altas. Todos os anestésicos testados foram eficientes para induzir estágio de anestesia cirúrgica e as concentrações de 75mg/L de benzocaína e 0,8 mL/L de 2-fenoxietanol e eugenol apresentaram bons tempos de indução e recuperação acompanhado dos menores níveis séricos de cortisol e glicose plasmática.

Palavras chave: Pintado, estresse, cortisol, glicemia, parâmetros hematológicos, anestésicos.

Abstract

The number of species farmed in Brazil, including the pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) has been increasing making necessary better knowledge of their physiology and farming techniques. The aim of this study was evaluate the circadian variations of blood cortisol and glucose without stressfull agents and physiological responses (blood levels of cortisol and glucose; liver and muscle glycogen; plasma chloride and osmolarity; hemathocrit, number e volume of red cells and hemoglobin) of juvenile fish submitted to different farming conditions (12h transport; alteration of photoperiod - 24 h exposure to continuous light or continuous darkness; exposure to benzocaine, phenoxyethanol and clove oil). There was no statistical among cortisol levels, but numerically the day profile was different of the night profile, showing peaks of cortisol secretion at the set up of the darkness and light. Blood glucose was not correlated to cortisol profile and had the levels more constant during the night. In the transport experiment, the cortisol levels increased along the procedure followed by a gradual reduction that reached values below the control 48, 72 and 96 h after the operation. Glucose increased after transport returning to basal levels within 72h as well muscle lipid levels. Blood colessterol and protein also increased. Chloride was reduced after transport as well as hematocrit, number of red cells and hemoglobin. Metabolic data suggest the use of another energy source in place of glucose to attend the stress demand. In the experiment in which fish were submitted to 24 h of light or darkness, blood cortisol did not differ statistically, but the values found in fish under 24 h of light were numerically higher compared to those of fish under darkness and both compared to control fish. Glicemia was numerically reduced in fish under darkness. No osmorregulatory disturbance was seen. Hematocrit, number of red cells and hemoglobin had the same profile increasing after 24 and 72 h of exposure of either light or darkness trending to be higher in fish exposed to light. Lately, fish were exposed to anesthetic (25, 50 and 75 mg/L benzocaine; 0.2, 0.4 and 0.8 mL/L of phenoxyethanol and clove oil). Blood cortisol levels reduced as the eugenol concentration increased, and the same profile was observed with phenoyethanol. No difference was observed regarding benzocaine. Similarly, glucose reduced with the anesthetics increased, being the lower levels found in the lower concentrations of both anesthetics. Similar profile of reduction was seen regarding to benzocaine and eugenol in hematocrit, number of red cells and hemoglobin. In all three anesthetics, the lowest concentrations promoted the higher time

of anesthetic induction. The recovery time did not differ between benzocaine and phenoethanol, but clove oil showed the highest times at the highest concentrations. All anesthetics tested induced surgical state of anesthesia and concentrations of 75mg/L benzocaine and 0.8 mL/L 2-phenoxyethanol and clove oil presented appropriate times of anesthetic induction and recovery at the same time of the lowest blood levels of cortisol and glucose.

Key words: Pintado, stress, cortisol, glicemia, hematological parameters, anesthetics.

CAPÍTULO I
Introdução Geral

Introdução geral

1. Panorama da aquicultura e produção de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)

O crescimento da aquicultura mundial tem sido constante, passando de 3,9% da produção total em 1970 para 36,5% em 2006. Nesse mesmo período, o crescimento da produção aquícola foi mais rápido que o da população humana e o fornecimento per capita passou de 0,75 kg em 1970 para 7,8 kg em 2006, o que equivale a um crescimento médio anual de 7,0% (FAO, 2009).

A aquicultura mundial registrou em 2006 uma produção de 51,7 milhões de toneladas com valor de 78.800 USD. Isso sugere que a aquicultura continua crescendo a um ritmo maior que outros setores de produção de produtos de origem animal. As taxas de crescimento anual da produção aquícola mundial entre 2004 e 2006 foram de 6,1% em volume e de 11,0% em valor (FAO, 2009).

A produção aquícola e pesqueira brasileira alcançaram, no ano de 2004, um volume de 1.015.916 toneladas e apresentou um acréscimo de 2,6% em relação ao ano de 2003. A aquicultura participou com 26,5% (269.697,50 toneladas) na produção total do Brasil, gerando US\$ 965.627,60 (FAO, 2006). Progressivamente, o Brasil vem ganhando posições no ranking internacional estabelecido pela FAO. Em 1994, era o 32º em produção aquícola e o 26º, em termos de valores. Em 2004, o Brasil ocupava o 18º lugar no ranking mundial de produção aquícola com 0,5% da produção mundial e o 12º em termos de receitas geradas com 1,4% do total (FAO, 2006).

O Brasil é o segundo país em importância na produção aquícola da América do Sul, ficando apenas abaixo do Chile. Comparada com outras atividades nacionais, a aquicultura apresenta resultados de crescimento superiores aos da pesca extrativa e também se sobressai com relação à produção de aves, suínos e bovinos, que nos últimos anos apresentaram taxas de crescimento inferiores a 5% ao ano (Baldisserotto, 2009).

A FAO estima que, em 2030, o consumo médio mundial de pescado chegará a 22,5 kg/hab/ano, o que implicará na necessidade de uma oferta adicional de 100 milhões de toneladas de pescado. A FAO acredita que o Brasil poderá produzir cerca de 20 milhões de toneladas de pescado, aumentando significativamente sua contribuição na oferta global, nos próximos 23 anos. O Brasil apresenta condições favoráveis para a expansão de sua produção pela abundância de recursos hídricos, clima predominantemente tropical, e tecnologia pesqueira em desenvolvimento (Pereira,

2007). Além disso, uma característica importante do potencial da piscicultura brasileira é o grande número de espécies criadas, cada uma com suas peculiaridades e diferentes formas de cultivo (Baldisserotto e Gomes, 2005). Entre estas espécies, destaca-se o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), pertencente à ordem dos Siluriformes. O gênero *Pseudoplatystoma*, que inclui a maioria dos peixes da família Pimelodidea, pode ser encontrado nas bacias do rio Amazonas e São Francisco, bem como bacia do Prata, formado pelos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Fowler, 1951; Sato et al., 1997; Agostinho et al., 2004; Campos, 2005). O pintado apresenta alta taxa de crescimento com potencial para alcançar 50 kg na natureza (Sato et al., 1997). É uma das espécies mais atingidas pela construção de hidroelétricas (Behr e Hayashi, 1997), pela poluição dos rios, pelos assoreamentos provocados por desmatamento das matas ciliares (Toledo, 1991) e intensificação da pesca predatória (Campos, 2005).

O pintado é uma espécie carnívora, de hábitos noturnos (Agostinho et al., 2004; Campos, 2005), que tem demonstrado crescimento satisfatório em sistemas de criação onde são alimentados com ração contendo alto teor de proteína de origem animal (Inoue et al., 2003). A espécie pode atingir, em um ano, peso duas vezes maior que o de algumas espécies produzidas atualmente (Gonçalves e Carneiro, 2003). Segundo Campos (2005), o pintado possui uma grande capacidade de crescimento, atingindo 2,0 kg/ano, tamanho estabelecido pelo mercado consumidor. Sua carne é considerada nobre, tanto pelo gosto como pela ausência de espinhos intramusculares, sabor pouco acentuado e baixo teor de gordura (Sato et al., 1997). É também muito apreciado na pesca esportiva e reúne atributos favoráveis para a criação industrial, como crescimento rápido, eficiente conversão alimentar, alto valor econômico, grande aceitação no mercado nacional, filé sem espinhos e com padrão para exportação (Rotta e Gonda, 2004).

A demanda pela espécie como peixe de mesa, esportivo e ornamental, além dos efeitos da ação antrópica, tem causado declínio da população natural (Campos, 2005), o que aumenta a importância da produção como forma de oferta do pintado ao mercado. Seu cultivo em alta escala, entretanto, sempre esbarrou na viabilização da produção de juvenis e na ausência de tecnologia para a engorda. Com o desenvolvimento da tecnologia de produção de juvenis e da engorda, especialmente por produtores particulares localizados no estado do Mato Grosso do Sul, a criação de pintado se encontra em franca expansão (Campos, 2005). As principais regiões produtoras de pintado são a Sudeste, Nordeste e Centro-oeste (Roubach et al., 2003). De acordo com

dados do IBAMA (2007), a produção ainda é baixa, com cerca de 1245,5 toneladas, concentrada na região Centro-oeste.

Pelas características apresentadas, o pintado merece atenção quanto ao conhecimento de suas exigências fisiológicas, nutricionais, comportamentais e ambientais, a fim de viabilizar sua criação. Embora estudos sobre a nutrição (Machado, 1999; Martinho et al., 2002a,b; Martino et al., 2005; Noffs et al., 2009), alimentação (Guerreiro Alvarado, 2003), genética (Revaldaves et al., 2005), reprodução (Sato et al., 1997; Brito e Bazzoli, 2003), crescimento (Arslan et al., 2009) e manejo (Moraes e Bidinotto, 2000; Lima et al., 2006; Fagundes e Urbinati, 2008) venham sendo desenvolvidos, ainda há necessidade de se conhecer melhor suas características fisiológicas para que os prejuízos causados pelas técnicas de criação possam ser minimizados.

2. O manejo na aquicultura e seus efeitos na fisiologia dos peixes

Durante o processo de criação, os peixes são constantemente submetidos a diferentes procedimentos de manejo e variações ambientais, que alteram o equilíbrio orgânico e podem levar a inibição do crescimento, falhas na reprodução e resistência reduzida a alguns patógenos (Wenderlaar Bonga, 1997), com conseqüente prejuízo para o produtor. Com isso, existe um crescente interesse na busca de soluções que permitam minimizar os danos causados pelo manejo, já que os procedimentos considerados adversos aos peixes são inevitáveis durante todas as fases de produção.

2.1. Mecanismo de estresse em peixes

O estresse pode ser definido como uma condição na qual o equilíbrio fisiológico dinâmico, ou homeostase, de um determinado organismo é perturbado ou influenciado por um estímulo intrínseco ou extrínseco, denominado estressor (Pickering, 1981). Recentemente, tem-se verificado que os principais mecanismos do controle neuroendócrino de resposta de estresse em peixes são comparáveis aos existentes em mamíferos e outros animais terrestres, apesar de muitas reações serem típicas do grupo (Barton, 2000).

Segundo Barton e Iwama (1991), os peixes têm uma capacidade natural de responder fisiologicamente aos estressores, para controlar o distúrbio imposto. Entretanto, quando os mecanismos de respostas são forçados, além de seus limites normais, a resposta do corpo pode ser deletéria à saúde do animal. A exposição aos

agentes estressores pode ser aguda ou crônica. A aguda geralmente ocorre durante o manejo, em condições como captura, biometria e transporte. A crônica ocorre em condições que expõem os peixes, por longos períodos, em situações estressantes, como criação em ambiente com baixa qualidade da água ou oscilações frequentes nos parâmetros físico-químicos e superpopulação, que podem levar a baixa taxa de crescimento e reprodução e comprometimento do sistema imunológico (Wendelaar Bonga, 1997).

A resposta de estresse, desencadeada por agentes estressores, compreende uma série de alterações fisiológicas que são classificadas em respostas primárias, secundárias e terciárias. Entre as respostas primárias, destaca-se o aumento na secreção de catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, e cortisol no plasma, enquanto entre as respostas secundárias estão as respostas metabólicas, como a alteração na glicemia, no ácido lático e no glicogênio hepático e muscular; as respostas hematológicas, como alteração no hematócrito e no número de linfócitos, e ainda as respostas que afetam o balanço hidromineral, como alteração nas concentrações de cloreto, sódio, potássio, proteínas e na osmolaridade do plasma. As respostas terciárias principais são alterações que levam a queda de desempenho produtivo e a diminuição da resistência a doenças (Wendelaar Bonga, 1997).

2.2. Práticas da criação que causam estresse em peixes

Muitos são os fatores que, individualmente ou em conjunto, podem impor estresse no sistema fisiológico dos peixes (Adams, 1990). Podem ser destacados: mudanças abruptas ou extremas no ambiente físico (temperatura, turbidez), alteração na qualidade da água (parâmetros químicos, como pH incorreto, baixo nível de oxigênio dissolvido, concentração elevada de amônia), estação do ano, idade, sexo, parasitismo, características individuais, herdáveis ou adquiridas, e mesmo linhagens ou espécies diferentes. Além destes fatores, pode-se destacar os fatores sociais (interações sociais, como predação, competição intensiva por espaço, alimento ou parceiros sexuais) e interferência humana, como as que incluem as práticas de rotina na piscicultura (captura, manuseio, transporte, densidade populacional) e poluição da água (alteração do pH, presença de metais pesados e químicos orgânicos) (Wendelaar Bonga, 1997).

2.2.1. Transporte de peixes vivos

O transporte é uma das práticas da aquicultura considerada como uma importante fonte de estresse para os peixes (Carmichael et al., 1983; Robertson et al., 1987; Weirich e Tomasso 1994; Carneiro e Urbinati, 2001b; Carneiro et al., 2008). Como em outras situações adversas, o transporte dos peixes promove grande variação nas respostas fisiológicas de estresse e a história genética pode contar muito para explicar a variação inter-específica que ocorre (Barton, 2000).

O transporte é considerado um procedimento traumático, pois expõe os peixes a uma série de fatores adversos, que inclui desde a captura nos tanques de produção, o manejo, o transporte em si, até a soltura dos animais e a estocagem nos tanques de recepção (Specker e Schreck, 1980; Barton e Peter, 1982; Johnson e Metcalf, 1982; Carmichael et al., 1983; Robertson et al., 1987; Robertson et al., 1988; Staurnes et al., 1994; Iversen et al., 1998; Takahashi et al., 2006). Peixes transportados em altas densidades ficam em contato físico direto com os outros animais, gerando abrasão mecânica e lesões na superfície do corpo (Ross e Ross, 1999). Além disso, o transporte em sistemas fechados resulta em alteração e deterioração da qualidade da água, outro fator limitante ao bem estar dos peixes (Berka, 1986; Ross e Ross, 1999; Emata, 2000). Carneiro et al. (2009), ao transportarem juvenis de jundiá (*Ramdia quelen*) por quatro horas em diferentes densidades, observaram um aumento gradual nos níveis de amônia na água acompanhando o aumento da densidade de transporte.

Alterações hormonais, metabólicas, iônicas e hematológicas, típicas de condição de estresse, foram registradas em várias espécies submetidas ao transporte, tais como truta (*Salmo gairdneri*); “smallmouth bass” (*Micropterus dolomieu*); salmão (*Onchorhynchus kisutch*); “red drum” (*Sciaenops ocellatus*); tambaqui (*Colossoma macropomum*); pirarucu (*Arapaima gigas*); perca (*Perca fluviatilis* L.); matrinxã (*Brycon amazonicus*); “flounder” (*Pseudopleuronectes untericanus*); salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.); pacu (*Piaractus mesopotamicus*); “rohu” (*Labeo rohita*); pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*); jundiá (*Rhamdia quelen*), “kingfish” (*Seriola lalandi*) (Barton e Peter, 1982; Carmichael et al., 1983; Redding e Schreck, 1983; Gomes et al., 2003a, b, c; Acerete et al., 2004; Urbinati et al., 2004; Iversen et al., 2005; Takahashi et al., 2006; Hasan e Bart, 2007; Carneiro et al., 2008; Fagundes e Urbinati, 2008; Moran et al., 2008; Carneiro et al., 2009; Iversen et al., 2009).

Gomes et al. (2003c) avaliaram juvenis de tambaqui em transporte de três horas e observaram aumento nos níveis de cortisol e glicose plasmática. O mesmo foi observado em matrinxãs (*Brycon cephalus*), transportados por quatro horas (Urbinati e Carneiro, 2001; Urbinati et al., 2004), quando se observou, além de um aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, uma diminuição na concentração de sódio e cloreto na chegada do transporte, resultados que se mantiveram até 24 horas depois. O nível plasmático de potássio aumentou após o transporte, retornando aos valores iniciais em 24 horas. Acerete et al. (2004), ao avaliarem um transporte de *Perca fluviatilis* por quatro horas, observaram aumento nos níveis de cortisol, glicose e lactato em relação ao controle. No caso de transporte de juvenis do salmão do Atlântico em barcos comerciais (Iversen et al., 2005), a elevação máxima dos níveis de cortisol no sangue ocorreu uma hora após o transporte.

O transporte de peixes é um procedimento inevitável e pode acarretar em redução na mortalidade se medidas adequadas e algumas precauções forem tomadas. Para isso, alguns critérios devem ser seguidos. A qualidade da água (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia, dióxido de carbono) deve ser adequadamente controlada

(Berka, 1986; Ross e Ross, 1999; Emata, 2000) e uma densidade apropriada de peixes utilizada (Carneiro e Urbinati, 2002). O uso de agentes redutores de estresse tais como anestésicos, sal e sulfato de cálcio durante o transporte, pode minimizar os efeitos negativos do estresse (Mcavoy e Zaepfel, 1997; Carneiro e Urbinati, 2001a; Small, 2003; Bendhack e Urbinati, 2009; Iversen et al., 2009), e as precauções na estocagem após o transporte poderão aumentar a condição de bem estar dos animais (Takahashi et al., 2006). O transporte reduz a capacidade dos peixes de tolerar a ação de um segundo agente estressor, como uma densidade de estocagem inadequada e prolongada (Specker e Schreck, 1980).

2.2.2. Importância do fotoperíodo na fisiologia dos peixes

Alguns trabalhos têm abordado os efeitos da intensidade luminosa (Pienaar, 1990; Stefansson et al., 1993; Duray et al., 1996; Pereira, 2001; Freiden et al., 2006), cores (Loukashkin e Grant, 1959; Heichenbach-Klinke, 1982; Volpato, 2000; Barcellos et al., 2009) e do fotoperíodo (Reynalte-Tataje et al., 2002; Trotter et al., 2003) na fisiologia de peixes. De acordo com Barton (2000), vários fatores ambientais tais como temperatura, salinidade, hora do dia, comprimento de onda da luz e cor de fundo dos tanques podem influenciar a resposta de estresse dos peixes.

No ambiente natural, os peixes estão expostos a comprimentos de onda que passam pelo azul, verde e infravermelho (Levine e McNichol Jr, 1982). Nas larvas, a visão tem importância destacada, pois larvas de peixes são reconhecidamente predadoras visuais. Muitas espécies eclodem com olhos sem pigmentação, sendo considerados não funcionais, tanto histologicamente como comportamentalmente. Porém, no início da alimentação exógena (captura de alimentos externos) todas as espécies apresentam olhos funcionais, permitindo a larva capturar alimento. No entanto, neste primeiro momento, a visão ainda é reduzida, aumentando com o crescimento (Pereira, 2001).

O fotoperíodo tem influência sobre o biorritmo dos animais, afetando parâmetros fisiológicos (Biswas e Takeuchi, 2002). Salmões, durante uma simulação de transporte, apresentaram uma redução da resposta hormonal de estresse em 25%, quando protegidos da luz, quando comparados aos não protegidos (Wedemeyer, 1985). Fagundes e Urbinati (2008) submeteram juvenis de pintado a exposição contínua a luz e escuridão para avaliação dos parâmetros fisiológicos e observaram que ambos regimes de luz influenciaram negativamente a respostas de estresse nos peixes. Estudo realizado com bagre africano (*Clarias gariepinus*) mostrou que à medida que as horas de luz

aumentavam em um ciclo de 24 horas, os peixes se tornavam mais agressivos e estressados, em relação a peixes expostos a redução do número de horas de luz. Sob períodos mais longos de exposição à luz, os peixes apresentavam atividade natatória mais intensa, maior agressividade e níveis mais elevados de cortisol (Almazán-Rueda et al., 2005).

Salaro et al. (2006) avaliaram o crescimento de trairão (*Hoplias lacerdae*) na ausência de luz, e não observaram efeitos no desempenho produtivo dos alevinos, enquanto Luz e Portella (2002) observaram 100% de sobrevivência nos animais mantidos a baixa intensidade luminosa. Já piracanjubas (*Brycon orbignyanus*) mostraram efeitos positivos da luz sobre a sobrevivência dos peixes (Reynalte-Tataje et al., 2002).

Alguns autores têm utilizado diferentes cores em pesquisas com peixes. Volpato e Barreto (2001) testaram efeito da luz azul, verde e branco em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) e observaram que na luz azul os peixes apresentaram as menores concentrações de cortisol.

Estudo recente com jundiá (Barcellos et al., 2009) avaliou se a cor dos tanques e disponibilidade de abrigos poderia afetar a resposta de estresse em alevinos e concluiu que a adaptação de 10 dias em tanques brancos e azuis não afetou a resposta do cortisol a um estressor agudo, mas a cor do tanque combinada com a presença de um abrigo pode reduzir tanto a magnitude quanto a duração da resposta de liberação do cortisol.

Em estudo com sardinha do Pacífico (*Sardinops caerulea*), os efeitos da cor ambiente foram associados a mudanças na formação de cardumes, reação de alarme e atração por cores (Loukashkin e Grant, 1959). Larvas de tambaqui criadas em tanques de cor verde claro apresentaram sobrevivência de 50% a mais que as criadas em tanques de cor marrom escuro, sob condições estressantes (Pereira, 2001). Segundo o mesmo autor, a influência da cor do tanque ou incubadora pode minimizar o canibalismo de larvas de matrinxãs. Weingartner e Zaniboni-Filho (2004) testaram a sobrevivência de larvas de pintado amarelo em tanques brancos e pretos e não observaram diferenças na sobrevivência em ambas as cores.

O pintado é um peixe de hábito alimentar noturno (Agostinho et al., 2004), e durante o dia torna-se quieto e permanece no fundo do rio ou dos ambientes de criação (Campos, 2005). Estudo prévio indicou que tanto a exposição à luz contínua quanto ao escuro parecem afetar negativamente o pintado (Fagundes e Urbinati, 2008).

2.2.3. Uso de anestésico para redução de estresse em peixes

Algumas técnicas são utilizadas para minimizar o estresse de peixes de criação, tais como uso de anestésicos (Mcavoy e Zaepfel, 1997; Ross e Ross, 1999; Griffiths, 2000; Urbinati e Carneiro, 2001; Carneiro e Urbinati, 2001b; Small, 2003; Iversen et al., 2009), sal (Wurts, 1995; Carneiro e Urbinati, 2001a), sulfato de cálcio (Bendhack e Urbinati, 2009) e imunoestimulantes (Anderson, 1992; Sakai, 1999).

A utilização de anestésicos na piscicultura pode reduzir o estresse e a mortalidade durante o manejo (Façanha e Gomes, 2005). Várias são as drogas usadas como anestésicos para peixes, sendo as mais comuns a tricafina metanosulfato (MS-222), a quinaldina, o 2-fenoxietanol (Mgbenka e Ejiofor, 1998; Ross e Ross, 1999; Hovda e Linley, 2000), a benzocafina (Gomes et al., 2001; Urbinati e Carneiro, 2001b) e o eugenol (Inoue e Moraes, 2007).

A utilização de anestésicos em peixes exige alguns cuidados como a observação dos estágios de anestesia, que são classificados como: sedação leve, perda de reação a movimentos visuais e ao toque; anestesia leve, perda parcial do equilíbrio; anestesia profunda, perda total do equilíbrio; anestesia cirúrgica I, diminuição do movimento opercular; anestesia cirúrgica II, mínimo movimento opercular e o peixe fica estático; colapso medular, overdose e recuperação, recuperação do equilíbrio e natação normal (Roubach e Gomes, 2001). O estágio normalmente utilizado para biometria, manuseio de peixes e reprodutores é a anestesia profunda e, este estágio deve ser atingido entre um a três minutos. Para avaliação da sanidade e intervenção cirúrgica o estado desejado é o de anestesia cirúrgica e este estágio deve ser alcançado entre três a cinco minutos. A recuperação dos animais deve ser rápida, não ultrapassando cinco minutos (Roubach e Gomes, 2001).

Fatores biológicos e ambientais podem influenciar a anestesia nos peixes. Entre os fatores biológicos devem-se considerar as diferenças entre as espécies, como o formato do corpo e tamanho da área branquial, e as diferenças entre os peixes de uma mesma espécie, tais como tamanho, variação na taxa metabólica e quantidade de gordura corporal. Entre os fatores ambientais de maiores importância na anestesia dos peixes de água doce, destacam-se a temperatura e o pH. A temperatura determina a taxa metabólica do peixe, quanto mais alta, maior a taxa metabólica e, conseqüentemente, mais rápida a indução. Já o pH da água está diretamente ligado à eficiência de certos anestésicos como quinaldina e com a reação estressante dos peixes a baixo pH quando expostos ao MS-222 e 2-fenoxietanol (Roubach e Gomes, 2001; Zuccarelli e Ingermann, 2005).

A benzocafina é um anestésico muito utilizado no Brasil. Resultados encontrados por Gomes et al. (2001) em juvenis de tambaqui sugerem que a benzocafina atende a todos os critérios estabelecidos por Ross e Ross (1999) como um anestésico ideal para peixes. A exposição a este fármaco não implica em redução de crescimento e na atividade reprodutiva do peixe (Ross e Ross, 1999). De acordo com estes mesmos

autores, são necessários 21 dias para a comercialização dos peixes que foram submetidos à benzocaína e que serão utilizados para alimentação. A dosagem de benzocaína indicada para tilápia é 25-100 mg/L (Coyle et al., 2004), e para o tambaqui 100-150 mg/L (Gomes et al., 2001). Como a benzocaína e o MS-222 são derivados do ácido p-aminobenzóico, causam redução da ventilação das brânquias devido à depressão dos centros medulares respiratórios, tendo a hipóxia como consequência. A hipóxia é intensificada pela braquicardia e decréscimo do fluxo sanguíneo entre as brânquias (Tytler e Hawkins, 1981).

O óleo de cravo é resultado da destilação das folhas, flores (incluindo talo) da árvore de cravo (*Eugenia arnotica*) sendo a substância ativa o eugenol (Keene et al., 1998). e é utilizado em todo o mundo em aplicações que vão desde tempero até anestesia (Anderson et al., 1997). Ele vem sendo utilizado como anestésico de peixes em vários países, com vantagens econômicas e sem propriedades tóxicas aparentes (Soto e Burhanuddin, 1995; Inoue e Moraes, 2007). É um anestésico efetivo em carpas (*Cyprinus carpio*) em concentrações de 40-120 mg/L e em trutas (*Oncorhynchus mykiss*), doses mais baixas como 5 e 2 mg/L foram usadas para transporte, enquanto doses de 40-60 mg/L causaram efeitos de anestesia cirúrgica. Para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), a dose recomendada é de 100 mg/L (Coyle et al., 2004). Esse produto é rapidamente eliminado da corrente sanguínea dos peixes, em torno de 48 horas, sem a necessidade de um período de carência para consumo ou liberação de peixes previamente anestesiados no ambiente (Inoue e Moraes, 2007). Segundo Inoue e Moraes (2007), no entanto, dados reportando concentrações ideais de óleo de cravo para induzir a anestesia de peixes tropicais são escassos.

De maneira semelhante à benzocaína, o óleo de cravo tem várias características que o qualificam como um anestésico seguro, de baixo custo, grande eficácia, ampla margem de segurança para o peixe e ausência de toxicidade para o operador, nas doses utilizadas para peixes. Além disso, o óleo de cravo apresenta curto tempo de indução e alto tempo de recuperação anestésica, ideais para procedimentos mais demorados, quando comparado com o MS-222, nas mesmas concentrações (Keene et al., 1998).

O 2-fenoxietanol também tem sido usado para sedação de peixes. Sua solução é bactericida e fungicida e, por estas propriedades, é indicado para procedimentos cirúrgicos (Roubach e Gomes, 2001; Coyle et al., 2004). Possui uma margem relativamente grande de segurança, de 100 a 600 mg/L, sendo indicadas as concentrações de 300 a 400 mg/L para procedimentos curtos, e concentrações mais

baixas como 100 a 200 mg/L são seguras para sedações prolongadas, como em operações de transporte (Coyle et al., 2004).

São muitas as espécies de peixes criadas no Brasil, sugerindo um maior número de estudos com relação às doses e aos tipos de anestésicos usados para manipulação dos animais evitando prejuízos, como mortalidade, estresse, causados pelo uso errôneos destas substâncias.

Objetivo geral

Este projeto teve por objetivo avaliar o perfil circadiano do cortisol e da glicemia e as respostas fisiológicas de estresse no pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), quando submetido a diferentes tipos de agentes estressores comuns no manejo da criação (transporte, exposição à luz e exposição a três fármacos utilizados como anestésicos, benzocaína, fenoxietanol e óleo de cravo).

Objetivos específicos

Avaliar para cada agente estressor

- 1- As respostas hormonais do pintado por meio da determinação plasmática de cortisol
- 2- As respostas metabólicas do pintado por meio da concentração de glicose sanguínea, glicogênio hepático e muscular.
- 3- As respostas iônicas do pintado por meio da concentração plasmática de cloreto e da osmolaridade
- 4- As respostas hematológicas por meio dos valores de hematócrito, número e volume das células vermelhas sanguíneas e das concentrações de hemoglobina.

Bibliografia

ACERETE, L.; BALASCH, J.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004.

ADAMS, S.M. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress in fish. In: ADAMS, S.M. (Ed.). Biological indicators of stress in fish. **American Fisheries Society**, Bethesda. American Fisheries Symposium, v.8, p.1-9. 1990.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO Jr.; H.F. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. (Eds). Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries, and Conservation Status. **World Fisheries Trust/World Bank/IDRC**, 2004.

ALMAZÁN-RUDA, P.; VAN HELMOND, A.T.M.; VERRETH, J.A.J.; SCHRAMA, J.W. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v.67, p.1029-1039, 2005.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.281-307, 1992.

ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, v.17, p.301-307, 1997.

ARSLAN, M.; DABROWSKI, K.; PORTELLA, M.C. Growth, fat content and fatty acid profile of South American catfish, surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) juveniles fed live, commercial and formulated diets. **Journal of Applied Ichthyology**, v.25, p.73-78, 2009.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Editora UFMG. Santa Maria, 2005, p.460.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para futuro. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.291-299, 2009

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. **Aquaculture**, v.288, p.51-56, 2009.

BARTON, B.A.; PETER, R.E. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anesthesia, and cold shock. **Journal of Fish Biology**, v.20, p.39-51, 1982.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Diseases**, v.10, p.3-26, 1991.

BARTON, B.A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v.62, p.12-18, 2000.

BEHR, E.R.; HAYASHI, C. Alimentação de larvas *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) em bandejas berçário durante o período crítico. In: XII Encontro Brasileiro de Ictiologia, 1997, São Paulo / SP. **Resumos** do XII Encontro Brasileiro de Ictiologia. São Paulo - SP: Sociedade Brasileira de Ictiologia, v. único, p.51, 1997.

BENDACK, F.; URBINATI, E.C. Calcium sulfate as stress reducer in matrinxã (*Brycon amazonicus*) transportation. **Journal of Applied Ichthyology**, v.25, p.105-109, 2009.

BERKA, R. **The transport of live fish. A review.** EIFAC Technical Papers 48. FAO. Rome, Italy, 1986.

BISWAS, A.K.; TAKEUCHI, T. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss fed and unfed adult tilapia (*Oreochromis niloticus*). Part II. **Fisheries Sciences**, v.68, p.543-553, 2002.

BRITO, M.F.G.; BAZZOLI, N. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, p.624-633, 2003.

CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz. 1829). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Eds.). **Espécies nativas com potencial para piscicultura**. Editora UFSM, Santa Maria. p.327-343, 2005.

CARMICHAEL, G.J.; WEDMEYER, G.A.; MCCRAEN, J.D.; MILLARD, J.L. Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. **Progressive Fish-Culturist**, v.45, p.110-113, 1983.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characoidei) during transport. **Aquaculture Research**, v.32, p.297-304, 2001a.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Plasma electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. **Journal of Applied Aquaculture**, v.11, n.4, p.1-13, 2001b.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) at different densities. **Aquaculture International**, v.10, p.221-229, 2002.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C., BENDHACK, F. Osmoregulation and fish transportation. In: Fish Osmoregulation, Baldisserotto, B.; Mancera, J.M.; Kapoor, B.G. (Eds). **Science Publishers**. Enfield, NH, USA, p. 235-248, 2008.

CARNEIRO, P.C.F.; KAISELER, P.H.S.; SWAROFISKY, E. de A.C.; BALDISSEROTTO, B. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. **Neotropical Ichthyology**, v.7(2), p. 283-288, 2009.

COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. Anesthetics in aquaculture. **Southern Regional Aquaculture Center**. Publication n° 3900, 2004.

DURAY, M.H.; ESTUDILLO, C.B.; ALPASAN, L.G. The effect of background color and rotifer density on rotifer intake, growth and survival of the grouper (*Epinephelus suillus*) larvae. **Aquaculture**, v.146, p.217-224, 1996.

EMATA, C. Live transport of pond-reared milkfish *Chanos chanos* forskal broodstock. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.31, p.279-282, 2000.

FAÇANHA, M.F.; GOMES, L.C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossona macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, v.35(1), p.71-75, 2005.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v.276, p.112-119, 2008.

FAO. **El estado mundial de la pesca y a acuicultura 2008**. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO Roma, ISSN 1020-5500, 2009.

FAO. **Status of world aquaculture 2006**. Roma, 2006. (FAO Fisheries Technical Paper, 500). In: BALSISSEOTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para futuro. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.39, n.1, p.291-299, 2009.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivo de Zoologia do estado de São Paulo**, São Paulo, 3ª ed., v.6, p.405-625, 1951.

FREIDEN, A.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R.; REIDEL, A. Desenvolvimento de larvas de *Steindachneridion sp.* em diferentes condições de refúgio e luminosidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.133-137, 2006.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira)**, v.38(2), p.283-290, 2003a.

GOMES, L.C.; ROUBACH, R.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; URBINATI, E.C. Transport of pirarucu (*Arapaima gigas*) in a closed system. **Acta Amazônica**, v.33, p.637-642, 2003b.

GOMES, L.C.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; URBINATI, E.C. Effect of fish density on the stress physiological responses and mortality of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) during transportation. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.34, p.76-84, 2003c.

GOMES, L.C.; GOMES-CHIPPARI, R.A.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; LIMA-ARAÚJO, C.A.R.M. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.32, n.4, p.426-431, 2001.

GONÇALVES, E.G.; CARNEIRO, D.J. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p.779-786, 2003.

GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1453-1464, 2000.

GUERREIRO ALVARADO, C.E. **Treinamento alimentar de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829): Sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos.** Dissertação de Mestrado, Aqüicultura – Centro de Aqüicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2003, p.72.

HASAN, M.; BART, A.N. Effects of capture, loading density and transport stress on the mortality, physiological responses, bacterial density and growth of rohu *Labeo rohita* fingerlings. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.33, p.241-248, 2007.

HEICHENBACH-KLINKE, H.H. **Enfermedades de los Peces**. Editora Acribia, Zaragoza, Spain, 1982.

HOVDA, J.; LINLEY, T.J. The potential application of hypothermia for anesthesia in adult pacific salmon. **North American Journal of Aquaculture**, v.62, p.67-72, 2000.

IBAMA. **Estatística da Pesca de 2005**. Brasil – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília, 2007, p.147.

INOUE, L.A.K.A.; NETO, C.S.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.943-947, 2003.

INOUE, L.A.K.A.; MORAES, G. Óleo de cravo: Um anestésico alternativo para manejo de peixes. **Embrapa Amazônia Ocidental**, Manaus, ISSN 1517-3135, p.1-22, 2007.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; NILSSEN, K. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts. **Aquaculture**, v.168, p.387-394, 1998.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R.S.; ELIASSEN, R.A.; CARLSEN, K.T.; EVJEN, T. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts during commercial well boat transport, and effects on survival after transfer to sea. **Aquaculture**, v.243, p.373-382, 2005.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R.A.; FINSTAD, B. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar L.* transport and transfer to sea. **Aquaculture Research**, v.40, p.233-241, 2009.

JOHNSON, D.L.; METCALF, M.T. Causes and controls of freshwater drum mortality during transportation. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.111, p.58-62, 1982.

KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO C.G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89-101, 1998.

LEVINE, J.S.; McNICHOL JR, E.F. Color vision in fish. **Scientific American**, v.216, p.108-117, 1982.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; MALISON, J.A.; BARRY, T.P.; HELDJ, A. Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of surubim *Pseudoplatystoma sp.* **Journal of the World Aquaculture Society**, v.37, n.1, p.89-95, 2006.

LOUKASHKIN, A.S.; GRANT, N. Behavior and reactions of the pacific sardine, *Sardinops caerulea* (Girard), under the influence of white and colored lights and darkness. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v.29, p.509-548, 1959.

LUZ, R.K.; PORTELLA, M.C. Utilização de alimento vivo e alimento inerte na larvicultura de trairão *Hoplias lacerdae*. In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 23, Itajaí. **Anais....** Itajaí: SBZ, 2002 CD room.

MACHADO, J.H. **Desempenho produtivo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia.** Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Folho – UNESP, 1999.

MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L.C. Effect of dietary lipid level on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystoma corruscans*. **Aquaculture**, v.209, p.209-218, 2002a.

MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L.C. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) fed diets with animal and plant lipids. **Aquaculture**, v.209, p.233-246, 2002b.

MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L.C. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, v.11. p. 131-137, 2005.

McAVOY, S.E.; ZAEPFEL, R.C. Effects of tricaine methanesulfonate (MS-222) on hematocrit: first field measurements on blacknose dace. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.126, p.500-503, 1997.

MGBENKA, B.O.; EJIOFOR, E.N. Effects of extracts of dried leaves of *Erythrophleum suaveolens* as anesthetics on clariid catfish. **Journal of Applied Aquaculture**, v.8, p.73-80, 1998.

MORAES, G.; BIDINOTTO, P.M. Metabolic impact of handling on *Pseudoplatystoma corruscans*, a widespread teleost fish. In: **International Congress on Biology of Fish, 2000**, Aberdeen. Fish Biology, p.89-100, 2000.

MORAN, D.; WELLS, R.M.G.; PETHER, S.J. Low stress response exhibited by juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) exposed to hypercapnic conditions associated with transportation. **Aquaculture Research**, v.39, p.1399-1407, 2008.

NOFFS, M.D.; MARTINO, R.C.; TRUGO, L.C.; URBINATI, E.C.; FERNANDES, J. B.K.; TAKAHASHI, L.S. Dietary fish oil replacement with lard and soybean oil affects triacylglycerol and phospholipid muscle and liver docosahexaenoic acid content but not brain and eyes content of surubim juveniles *Pseudoplatystoma* sp. **Journal of Fish Physiology and Biochemistry**, v.35 p.399-412, 2009.

PEREIRA, L.G.C. Pesca e aquicultura no Brasil. **Consultor Legislativo da Área X Agricultura e Pesca**, p.1-15, 2007.

PEREIRA, M.M. Influência da cor e da luminosidade no cultivo de larvas de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, p.43-47, 2001.

PICKERING, A.D. Introduction: The Concept of Biological Stress. In: PICKERING, A.D. (Ed.) **Stress and fish**. Academic Press, p.367, 1981.

PIENAAR, A.G. **A study of coeval sibling cannibalism in larval and juvenile fishes and its control under culture conditions**. 1990. Dissertação (Mestrado) - Rhodes University, Grahamstown, 1990.

REDDING, J.M.; SCHRECK, C.B. Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling coho salmon during stress. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.112, p.800-807, 1983.

REVALDAVES, E.; PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: *Pimelodidae*) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v.5, n.3, p.463, 2005.

REYNALTE-TATAJE, D.; LUZ, R.K.; MEURER, S.; ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, v.24, n.2, p.439-443, 2002.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C.R.; TRANT, J.M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density and a disease outbreak. **The Progressive Fish-Culturist**, v.49, p.1-12, 1987.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C.R. Plasma cortisol and secondary stress response of cultures red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. **Aquaculture**, v.68, p.115-130, 1988.

ROSS, L.G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. **Blackwell Science**, Oxford, UK. 1999.

ROTTA, M.A.; GONDA, M.F. "Ictioproveta" para a biometria indireta do peso se surubins (pintado e cachara) utilizando seu volume e densidade. **Informativo técnico Embrapa**. Cuiabá- MS, ISSN 1517-4875, 2004.

ROUBACH, R.; GOMES, L.D.C. Uso de anestésico durante o manejo de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, v. II, n.66, p.37-40, 2001.

ROUBACH, R.; CORREIA, E.S.; ZAIDEN, S.F.; MARTINO, R.C.; CAVALLI, R.O. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v.34, n.1, p.28-34, 2003.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p.63-92, 1999.

SALARO, A.L.R.K.; ZUANON, J.A.S.; SIROL, R.N.; SAKABE, R.; ARAUJO, W.A.; SOUTO, E.E.F. Desenvolvimento de trairão (*Hoplias lacerdae*) na ausência de luz. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.28, n1, p.47-50, 2006.

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; SALLUM, W.B.; GODINHO, H.P. **Indução experimental da desova do surubim *Pseudoplatystoma corruscans***. In: MIRANDA, M.O.T. Surubim. IBAMA. Coleção Meio Ambiente, série Estudos Pesca, Belo Horizonte, v.19, p.69-79, 1997.

SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v.218, p.177-185, 2003.

SOTO, C.; BURHANUDDIN, A. Clove oil as a fish measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v.136, p.149-152, 1995.

SPECKER, J.L.; SCHRECK, C.B. Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.37, p.765-769, 1980.

STAURNES, M.; SIGHOLT, T.; PEDERSEN, H.P.; RUSTAD, T. Physiological effects of simulated high-density transport of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v.119, p.381-391, 1994.

STEFANSSON, S.O.; HANSEN, T.J.; TARANGER, G.L. Growth and parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under different light intensities and subsequent survival and growth in seawater. **Aquacultural Engineering**, v.13, p.231-243, 1993.

TAKAHASHI, L.S.; ABREU, J.S.; BILLER, J.D.; URBINATI, E.C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.28, p.469-475, 2006.

TOLEDO, L.R. Novo hóspede dos açudes. **Globo Rural**, São Paulo, p.54-61, 1991.

TROTTER, A.J.; BATTAGLENE, S.C.; PANKHURST, P.M. Effects of photoperiods and light intensity on initial swimming bladder inflation, growth and post inflation viability in cultured striped trumpeter (*Latris lineatus*) larvae. **Aquaculture**, v.224, n.1-4, p.141-158, 2003.

TYTLER, P.; HAWKINS, A.D. Vivisection, anaesthetics and minor surgery. In: HAWKINS, A.D. (Editor). **Aquarium Systems**. Academic Press, New York, p.247-278, 1981.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleost: Characidae), to transport stress under influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.16, n.1, p.75-85, 2001.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v.229, p.389-400, 2004.

VOLPATO, G.L. Aggression among farmed fish. In: FLOS, R.; CRESWELL, L. (Eds.) Aqua 2000: Responsible Aquaculture in the New Millennium. **European Aquaculture Society Special Publication**, Nice. n.28, 2000.

VOLPATO, G.L.; BARRETO, R.E. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.8,, p.1041-1045, 2001.

WEDEMEYER, G. Development and evaluation of transport media to mitigate stress and improve juvenile salmon survival in Columbia River bagging and trucking operations. **Contract Report to Bonneville Power Administration**, Portland, Oregon, n.82, p.19, 1985.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Efeito de fatores abióticos na larvicultura de pintado amarelo *Pimelodus macularus* (Lacepe 1803): salinidade e cor de tanques. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.26, n.2, p.151-157, 2004.

WEIRICH, C.R.; TOMASSO, J.R. Confinement and transport-induced stress on red drum juveniles: Effect of salinity. **The Progressive Fish-Culturist**, v.53, p.146-149, 1994.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WURTS, W.A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v.26, n.3, p.80-81, 1995.

ZUCCARELLI, M.D.; INGERMANN, R.L. Influence of neutralizing agents on the anaesthetic efficacy of tricaine on *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry. **Aquaculture Research**, v.36, p.933-935, 2005.

CAPÍTULO II

Perfil circadiano das concentrações de cortisol e glicose no sangue de pintado

(Pseudoplatystoma corruscans)

Resumo

Muitos processos fisiológicos e comportamentais expressos por organismos vivos são rítmicos, e ocorrem com periodicidade de cerca de 24 horas, caracterizando um ritmo circadiano. Na maioria dos vertebrados, o cortisol possui padrão diário de liberação, com níveis elevados pela manhã, decrescendo até o final do dia, relacionado a um ciclo claro-escuro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil circadiano nas concentrações de cortisol e glicose no sangue do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) durante um período de 24 horas, sem a utilização de estímulo estressor. Um total de 144 juvenis (peso médio $17,2 \pm 5,3$ g e comprimento médio $15,7 \pm 1,4$ cm) foi distribuído em 36 caixas (n=12) e as coletas foram realizadas no intervalo de duas em duas horas. Não foram observadas diferenças estatísticas, mas os valores de cortisol apresentaram variação de perfil no período diurno e noturno, com picos na instalação em condição de escuro e de claridade. A glicemia não apresentou correlação com o perfil do cortisol, mantendo valores mais constantes no período diurno.

Palavra chave: Pintado, cortisol, glicemia, ritmo circadiano.

Abstract

Many physiological and behavioral processes expressed in live organism are rhythmic and occur in a period of 24 hours, characterizing a circadian rhythm. In most vertebrates, cortisol has a diel release profile, showing higher levels in the morning which decrease up to the end of the day, related to a light-dark cycle. The aim of this study was to evaluate the variation in blood concentrations of cortisol and glucose in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) along 24 hours without a stressful condition in order to characterize their circadian profile. A total of 144 fish (mean weight 17.2 ± 5.3 g and mean length 15.7 ± 1.4 cm) were distributed into 36 aquaria (n=12) and samplings were performed at each two hours (6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 2 and 4 hours). There were not significant differences but the cortisol values presented a clear profile at day and night, showing peaks at the settling of darkness and light. Blood glucose did not present correlation to cortisol, keeping its values more stable along the day.

Key-words: Pintado, cortisol, glicemia, circadian rhythm

Introdução

Nos mamíferos, o cortisol é um glicocorticóide produzido e secretado pelo córtex adrenal e exerce um papel importante em vários órgãos e sistemas, participando da regulação fisiológica e da adaptação às situações de estresse. A concentração de glicocorticóides circulante é regulada através do ajuste do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, influenciado por fatores como o ritmo circadiano, o estresse e o feedback negativo (Matteri et al., 2000). Nos peixes, a resposta de secreção de cortisol em situações de estresse é controlada por um complexo sistema neuro-endócrino, envolvendo o sistema simpático-cromafim e o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal. Tanto as células cromafins, como o tecido interrenal, estão presentes no rim cefálico sendo responsáveis pela liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e de cortisol, respectivamente (Sumpter, 1997).

Em peixes, o cortisol apresenta dupla função: glicocorticóide e mineralocorticóide e afeta vários órgãos e sistemas. As brânquias, intestino e fígado são alvos importantes para o cortisol, os quais refletem as duas maiores ações deste hormônio, isto é, o controle do balanço hidromineral e do metabolismo energético (Wendelaar Bonga, 1997). O cortisol estimula a gliconeogênese, síntese de glicose a partir de substâncias que não sejam carboidratos, e regula a demanda de açúcar na circulação periférica, por antagonizar os efeitos da insulina pela diminuição significativa da respostas dos hepatócitos à insulina (Vijayan et al., 1994). Sendo assim, o cortisol tem a função de sustentar os altos níveis de glicose após a resposta inicial provocada pelas catecolaminas, tanto por estímulo da gliconeogênese quanto por regular o aporte periférico da glicose. A glicose produzida pela gliconeogênese é um importante aporte energético utilizando como ferramenta para enfrentar a demanda ocasionada pela resposta ao estresse e promover o depósito de glicogênio no fígado, para eventuais situações em que ele novamente seja utilizado (Barcellos et al., 2000). Sabe-se também que o mesmo afeta o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídeos (Mommsen et al., 1999). Aumenta a lipólise, resultando num maior aporte de ácidos graxos e glicerol para circulação e para gliconeogênese (Van Der Boon et al., 1991).

Já como mineralocorticóide o cortisol atua na regulação osmótica e iônica, sendo capaz de estimular a diferenciação de células de cloreto nas brânquias e o aumento da atividade específica das enzimas relacionadas ao transporte de íons, em particular a enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (Nolan, 2000).

A atuação do cortisol na defesa do organismo é estudada por vários autores que relatam uma imunossupressão associada aos altos níveis deste hormônio (Kebus et al., 1992; Iwama, 1993). Sendo assim, é notável a importância do conhecimento a respeito do comportamento de secreção do cortisol e sua variação diária como ferramenta para orientar as pesquisas que utilizam este hormônio como indicador fisiológico.

Nos peixes, muitas variáveis biológicas, incluindo hormônios e metabólitos, apresentam variações regulares diárias que são dependentes do fotoperíodo, regime alimentar, temperatura, entre outros fatores (Noeske e Spiller, 1983; Spiller e Noeske, 1984; Fivizzani et al., 1984; Boujard et al., 1993; Biron e Benfey, 1994; Pavlidis et al., 1999), indicando a existência de um sistema multioscilar em integração temporal do peixe com o ambiente.

Estudo com *Carassius auratus* mostrou que, quando os peixes eram mantidos em regime de 12L:12E (luz:escuro), as variações nas concentrações sanguíneas de cortisol foram sempre associadas ao regime alimentar com picos que variaram de 0 a 6 horas (especialmente quatro horas) antes da alimentação e a variação não foi afetada pelo período do dia em que ocorria a alimentação (Spiller e Noeske, 1984). Em outro estudo, quando a mesma espécie foi exposta durante um mês a quatro fotoperíodos diferentes, as variações do cortisol circulante foram bastante afetadas pelo fotoperíodo. Os valores mais altos do hormônio foram detectados próximo à instalação da claridade e os mais baixos quando tinha início a escuridão. Peixes mantidos por um mês em dois fotoperíodos diferentes tiveram variações circadianas na concentração de proteína plasmática, mas o padrão não foi consistente com qualquer característica dos fotoperíodos em questão (Noeske e Spiller, 1983).

Adicionalmente, estudo realizado com *Fundulus diaphanus* mostrou que, em peixes mantidos num regime de 12L:12E por 16 dias, a temperatura (5° ou 20°C) afetou o perfil de secreção do cortisol. Peixes aclimatados a 20°C apresentaram um padrão unimodal com um pico de concentração hormonal quatro horas antes da instalação da luz, enquanto aqueles aclimatados a 5°C apresentaram um padrão bimodal com picos de valores de cortisol na instalação da luz e na instalação da escuridão (Fivizzani et al., 1984). Os autores sugeriram que as mudanças induzidas poderiam ser decorrentes de outras mudanças sazonais dependentes da temperatura, tais como ciclo anual de maturação reprodutiva ou mudanças na atividade locomotora.

Variações circadianas nas concentrações séricas de glicose, lactato, colesterol e triglicerídeos foram determinadas em *Pagrus pagrus* em diferentes fotoperíodos

(escuridão constante, 8L:16E,12L:12E) e temperatura constante, recebendo alimento por meio de um comedouro automático. Houve uma clara atividade alimentar rítmica independente do fotoperíodo. Todos os componentes do soro apresentaram variações periódicas e as variações na amplitude de resposta foram dependentes do fotoperíodo (Pavlidis et al., 1999).

Em truta arco-íris, estudo a respeito do papel da alimentação e do fotoperíodo como sincronizador de variáveis metabólicas e endócrinas avaliou alterações no índice hepatossomático, concentração de glicogênio hepático, glicose plasmática, ácidos graxos não-esterificados, cortisol e outros hormônios no período entre duas horas antes do amanhecer e doze horas depois. Os animais tiveram diferente acesso livre à alimentação por três ou quatro horas, a partir do amanhecer. Houve um claro efeito do tempo de acesso ao alimento na maioria dos parâmetros com uma amplitude de variação reduzida, nos peixes que comeram no meio da fotofase, comparado com aqueles que comiam no início da fotofase (Byron e Benfey, 1994).

O pintado é um peixe de hábito alimentar noturno (Agostinho et al., 2004), e durante o dia torna-se quieto e permanece no fundo do rio ou dos ambientes de criação (Campos, 2005). Estudo realizado por Fagundes e Urbinati (2008) mostrou que tanto a exposição à luz contínua quanto à escuridão afetam respostas fisiológicas do pintado. Além disso, sabendo da importância do fotoperíodo, do horário de alimentação e da atividade como sincronizadores de ritmos endócrinos em outras espécies de peixes (Noeske e Spiller, 1983; Spiller e Noeske, 1984; Fivizzani et al., 1984; Boujard et al., 1993; Byron e Benfey, 1994; Pavlidis et al., 1999), é necessário conhecer o perfil de variação diária da secreção do cortisol para fundamentar melhor os estudos fisiológicos no pintado.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil circadiano fisiológico do cortisol e da glicose nesta espécie.

Material e Método

Juvenis de pintado adquiridos do Projeto Pacu (Campo Grande, MS), que foram aclimatados às condições experimentais por cerca de dois meses (outubro-novembro de 2006), em fotoperíodo natural (14L:12E), no Biotério do Departamento de Fisiologia Animal da UNESP Jaboticabal, onde permaneceram até o experimento, recebendo ração comercial (40% de proteína bruta) uma vez ao dia entre as 18:30 e 19 horas. Os animais foram considerados aclimatados quando começaram a se alimentar regularmente.

Um total de 144 peixes ($17,2 \pm 5,3$ g e $15,7 \pm 1,4$ cm) foi distribuído aleatoriamente em 36 caixas pretas de polietileno de 60 L (4 animais por caixa), cobertas com sombrite, com sistema de renovação de água e aeração constantes. A temperatura média da água das caixas foi $28,4 \pm 0,82$ °C e a concentração de oxigênio dissolvido $6,72 \pm 0,26$ mg/mL. O local não era totalmente isolado de movimentação. Os peixes não foram alimentados por 24 horas antes do experimento. A coleta de material biológico foi realizada com intervalo de duas em duas horas, por 24 horas, sendo amostrados quatro peixes de três caixas por coleta (n=12). Os animais foram anestesiados com benzocaína (50mg/L).

Amostragem e métodos de análise

Os animais amostrados tiveram o sangue coletado por punção do vaso caudal. Uma alíquota foi colocada em microtubos com 15 μ L de EDTA e fluoreto de potássio, centrifugada para separação de plasma (a 3000 rpm por 10 min a 4°C) e imediatamente a glicose foi determinada (Kit Labtest). O restante do sangue foi colocado em outros microtubos e permaneceram em repouso por duas horas para separação de soro por centrifugação (3000 rpm por 10 min, a 4°C). O soro resultante foi congelado para posterior análise de cortisol (Radioimunoensaio – kit DPC). Após coleta do material biológico, os animais foram pesados e medidos, antes de retornarem as caixas para recuperação.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5%.

Resultados

As concentrações de cortisol no sangue dos pintados não apresentaram diferença estatística entre os tempos amostrados, mas foram observados dois picos de secreção longo do período de amostragem. No período diurno, às 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas, os valores foram mais constantes (13,0; 13,8; 11,9; 12,9; 12,3 e 10,5 ng/mL, respectivamente). No período noturno, às 20, 22, 24 e 2 horas, ocorreram oscilações nos valores registrados (16,9; 18,4; 12,0 e 11,0 ng/mL, respectivamente), com valores de pico às 18 e 4 horas (24,7 e 27,3 ng/mL, respectivamente) (Figura 1).

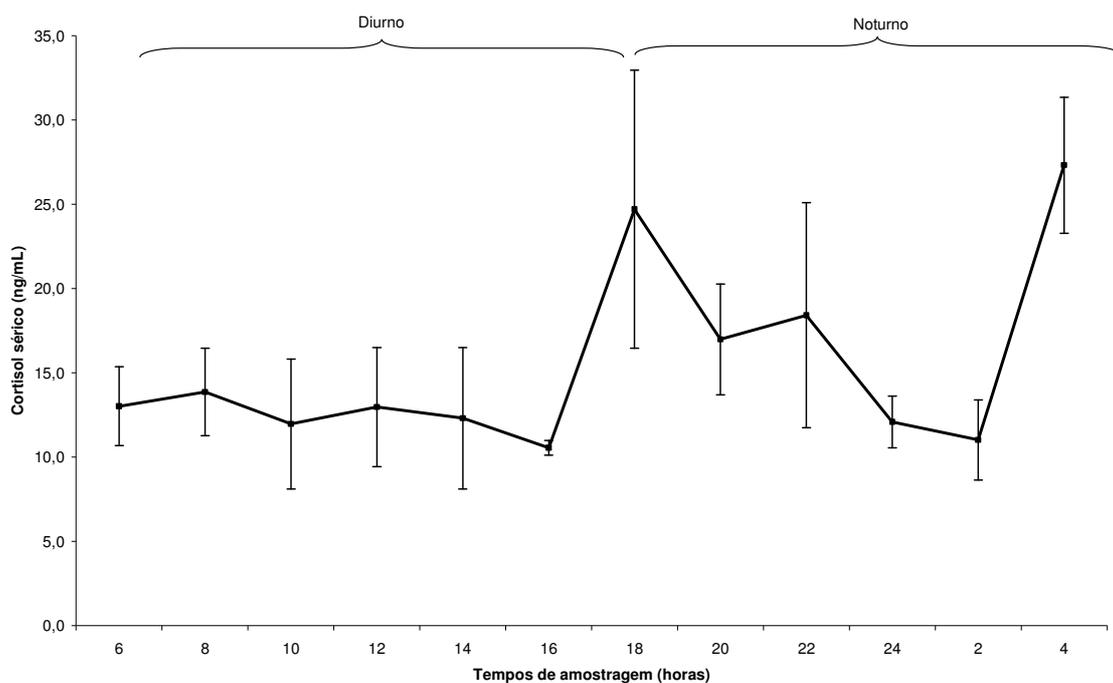


Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados em diferentes tempos de amostragem durante 24 horas. Valores são médias \pm EPM (n=6).

As concentrações de glicose no sangue dos pintados não diferiram estatisticamente, mas pode-se observar que durante o período de 24 horas de coletas ocorreram flutuações durante o dia e a noite, apresentando uma maior variação durante o dia. . Os valores mais elevados de glicemia foram observados às 4, 6, 10, 12 e 16 horas (33,0; 38,5; 35,4; 34,7 e 38,7 mg/L, respectivamente). No período diurno, os menores valores foram observados as 8 e 14 horas (26,7 e 24,6 mg/L, respectivamente). Entre 18 e 2 horas, os níveis glicêmicos foram constantes (26,8; 30,8; 29,0; 24,7 e 25,0 mg/L, às 18, 20, 22, 24 e 2 horas respectivamente) (Figura 2).

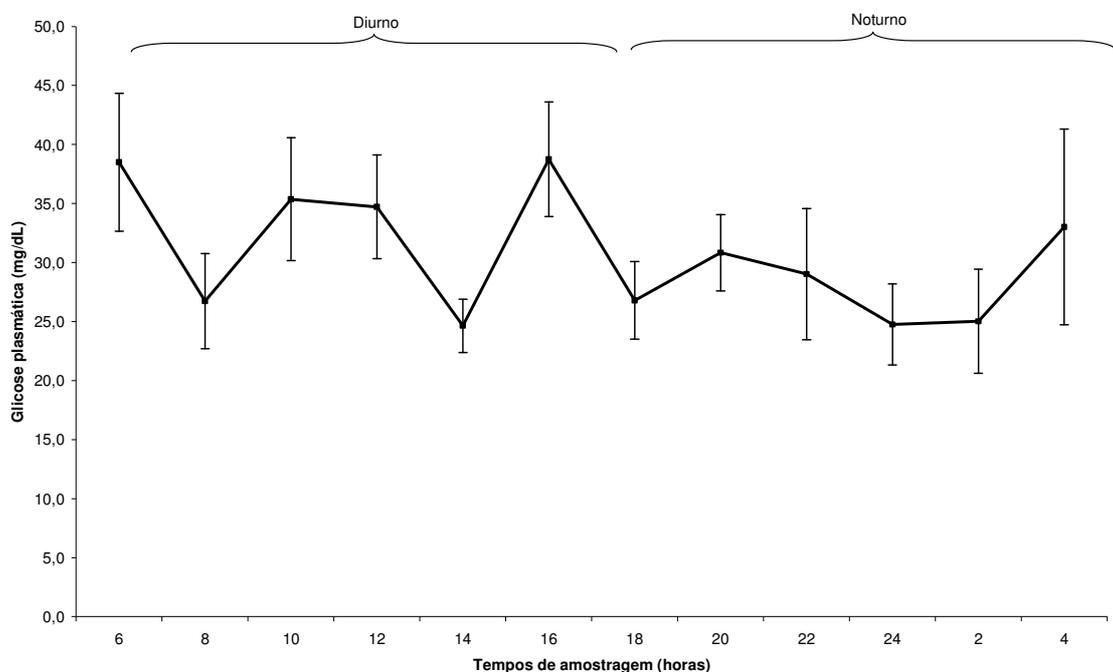


Figura 2: Glicose plasmática (mg/dL) de pintados em diferentes tempos de amostragem durante 24 horas. Valores são médias \pm EPM (n=12).

Discussão

Muitos processos fisiológicos e comportamentais expressos por organismos vivos são rítmicos, e ocorrem com periodicidade de cerca de 24 horas. Tais ritmos biológicos são referidos como circadianos. A periodicidade desses ritmos biológicos equivale aos ciclos diários de claro/escuro (Sheeba et al., 1999; Roenneberg e Merrow, 2002).

Na maioria dos vertebrados, o cortisol possui padrão rítmico diário de liberação, com níveis elevados pela manhã, decrescendo até o final do dia, ligado ao ciclo claro-escuro. Ele tem efeito retroalimentador negativo sobre o hipotálamo e sobre a adenohipófise, diminuindo a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), respectivamente. Desta forma, atua no controle e na regulação de sua concentração circulante (Matteri et al., 2000). O padrão circadiano, do ciclo noite-dia, é um ritmo biológico que ajuda a controlar muitos processos fisiológicos. Níveis basais de glicocorticóides em humanos são máximos durante as primeiras horas da manhã antes de acordar (Randall et al., 2000). O “relógio biológico” é uma rede neural localizada no núcleo supraquiasmático do hipotálamo basal e é responsável pelo ritmo circadiano de secreção de hormônios em mamíferos (Reuss, 1996). Estudos mostraram que se o sistema nervoso central for afetado, todos os ritmos circadianos de atividade biológica normal desaparecem (Zucker, 1980). Entretanto, em várias espécies de peixes, os ritmos endócrinos são alterados e sincronizados pelo fotoperíodo, horário de alimentação e atividade do animal (Noeske e Spiller, 1983; Spiller e Noeske, 1984; Fivizzani et al., 1984; Boujard et al., 1993; Byron e Benfey, 1994; Pavlidis et al., 1999).

O pintado é um peixe de hábito alimentar noturno que, durante o dia, torna-se quieto no fundo do rio ou dos ambientes de criação (Agostinho et al., 2004; Campos, 2005). Estudo anterior mostrou que a espécie tem respostas fisiológicas ligadas ao estresse afetadas tanto em condições de luz contínua quanto na ausência de luz (Fagundes e Urbinati, 2008).

No presente estudo, não se detectou diferenças significativas entre os valores de cortisol sérico encontrados, mas observou-se clara diferença entre o perfil dos valores encontrados no período diurno e noturno. Ao longo do dia, das 6 a 16 horas, as concentrações de cortisol foram mais constantes, e das 18 às 4 horas foram observados dois valores de pico (18 e 4 horas). Estes valores de pico ocorreram em tempos que

antecedem a instalação de condição de escuro e de claridade, sugerindo relação com o ciclo noite-dia. Experimento realizado com *Fundulus diaphanus* mantido em regime de 12L:12E, por 16 dias, a 5°C, mostrou um padrão bimodal de secreção com picos de valores de cortisol na instalação da luz e na instalação da escuridão (Fivizzani et al., 1984). Pode-se sugerir também relação do padrão bimodal de secreção de cortisol do pintado com o horário de alimentação e atividade locomotora do animal. Estudos com outras espécies de peixes relatam a sincronização de ritmos endócrinos pelo fotoperíodo (*Carassius auratus*, Noeske e Spiller, 1983; *Pagrus pagrus*, Pavlidis et al., 1999), horário de alimentação (*Carassius auratus*, Spiller e Noeske, 1984; *Salvelinus fontinalis*, Byron e Benfey, 1994), atividade locomotora dos peixes (*Fundulus diaphanus*, Fivizzani et al., 1984).

Com relação ao perfil circadiano da glicemia, não houve correlação com o perfil do cortisol. Os níveis de glicose foram mais constantes no período noturno, entre 18 e 4 horas, com flutuações evidentes no período diurno, e os maiores valores foram registrados às 6, 10, 12 e 16 horas. Variações circadianas nas concentrações séricas de glicose, bem como de outros metabólitos (lactato, colesterol e triglicerídeos) foram observadas em *Pagrus pagrus* expostos a escuridão constante, 8L:16E e 12L:12E. Todos os componentes do soro apresentaram variações periódicas e as variações na amplitude de resposta foram dependentes do fotoperíodo (Pavlidis et al., 1999). Estudo com truta arco-íris avaliou alterações em vários indicadores metabólicos (índice hepatossomático, concentração de glicogênio hepático, glicose plasmática, ácidos graxos não-esterificados), no período entre duas horas antes do amanhecer e doze horas depois, em animais que tiveram acesso livre à alimentação, por três ou quatro horas, a partir do amanhecer. Houve um claro efeito do tempo de acesso ao alimento na maioria dos parâmetros com uma amplitude de variação reduzida, nos peixes que comeram no meio da fotofase, em relação aos que comiam no início da fotofase (Byron e Benfey, 1994). No caso do pintado, as alterações observadas na glicemia podem estar ligadas à presença de estressores no ambiente de criação, considerando que os peixes foram mantidos em local que não era totalmente isolado de barulho e presença ocasional de pessoas. Em estudo com a truta *Salvelinus fontinalis*, Byron e Benfey (1994) associaram alterações na glicemia em resposta a estresse agudo, a despeito da influência de um ritmo diurno.

Conclusão

O presente trabalho pode observar que os níveis de cortisol sérico apresentam um padrão bimodal, onde os picos deste hormônio acontecem na instalação de condições de escuro e claridade. Os valores glicêmicos, no entanto, não apresentaram o mesmo perfil do cortisol, havendo maior flutuação no período diurno, que pode ser atribuída a presença de agentes estressores presentes no ambiente de cultivo, já que estes animais não eram mantidos em ambiente totalmente isolados.

Bibliografia

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO Jr. H.F. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds). Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries, and Conservation Status. **World Fisheries Trust/World Bank/IDRC**. 2004.

BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEHL, V.M. Estresse em peixes: Fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.

BYRON, M.; BENFEY, T.J. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, p.153-160, 1994.

BOUJARD, T.; BRETT, S.; LIN, L.; LEATHERLAND, J.F. Effect of restricted access to demand-feeders on diurnal pattern of liver composition, plasma metabolites and hormone levels in *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.11, p. 337-344, 1993.

CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz. 1829). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Eds.). **Espécies nativas com potencial para piscicultura**. Editora UFSM, Santa Maria. p. 327-343, 2005.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 276, p. 112-119, 2008.

FIVIZZANI, A.J.; SPIELER, R.E.; NOESKE, T.A. The influence of ambient temperature on the daily variation of serum cortisol in the banded killifish, *Fundulus diaphanous*. **Biological Rhythm Research**, v.15, p.3-8, 1984.

IWAMA, G.K. Intensive fish production: Course Manual UBC Access Guided Independent Study. **The University of British Columbia**, Vancouver, p. 130, 1993.

KEBUS, M.J.; COLLINS, M.T.; BROWNFIELD, M.S.; AMUNDSON, C.H.; KAYES, T.B.; MALISON, J.A. Effects of rearing density on stress response and growth of rainbow trout. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 4, p. 1-6, 1992.

MATTERI, R.L.; CAROL, J.A.; DYER, C.J. Neuroendocrine responses to stress. In: OBERG, G.P.; MENEH, J.A. (Ed.). **The biology of animal stress**. Oxon, England: CABI, Publishing, p. 43-76, 2000.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.

NOESKE, T.A.; SPILLER, R.E. Photoperiod and diel variations of serum cortisol, thyroxine and protein in goldfish, *Carassius auratus* L. **Journal of Fish Biology**, v.23, p.705–710, 1983.

NOLAN, D.T. **Skin response of fish to stressors**. Tese de Doutorado. Universidade Católica de Nijmegen, Holanda, 2000. In: SAKURAGUI, M.M. Respostas ao estresse osmótico e hipotóxico em traira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) aspectos fisiológicos e adaptativos. Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2006.

PAVLIDIS, M.; PASPATIS, M.; KOISTINEN, M.; PAAVOLA, T.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. Diel rhythms of serum metabolites and thyroid hormones in red porgy held in different photoperiod regimes. **Aquaculture International**, v. 7, p. 29-44, 1999.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal mecanismos e adaptações**. Editora Guanabara, 4ª Ed., 2000.

REUSS, S. Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* 285, 353-378, 1996.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. Life before the clock: modeling circadian evolution. **Journal of Biological Rhythms**, v. 17, n.6, p. 495-505, 2002.

SHEEBA, V.; SHARMA, V.K.; JOSHI, A. Adaptive significance of circadian rhythms. **Resonance**, p. 73-75, 1999.

SPILLER, R.E.; NOESKE, T.A. Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.113, p.528-539, 1984.

SUMPTER, J.P. The endocrinology of stress. In IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. Fish stress and health in aquaculture. **Cambridge University Press**, New York, p. 95-118, 1997.

VAN DER BOON, J.; VAN DEN TRILLART, G.E.E.J.M.; ADDINK, A.D.E. The effect of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.100A. n.1, p. 47-53, 1991.

VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. **General and Comparative Endocrinology**, v.96, p. 75-84, 1994.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

ZUCKER, I. Light, behavior, and biologic rhythms. In: KRIEGER, D.T., HUGHES, J.C. (Eds.), *Neuroendocrinology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 93-101, 1980.

CAPÍTULO III

Respostas fisiológicas de estresse no transporte de pintado (*Pseudoplatystoma
corruscans*).

Resumo

O transporte de peixes vivos está entre um dos manejos mais comuns dentro de um sistema de criação de peixes. Trata-se, porém, de um procedimento bastante traumático, responsável por inúmeras reações fisiológicas e metabólicas, devido a uma sucessão de estímulos adversos, podendo levar a perdas consideráveis. O objetivo deste experimento foi avaliar respostas fisiológicas e bioquímicas do estresse de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) transportado por 12 horas em sistema fechado. Foram utilizados 60 peixes ($66,6 \pm 18,3$ g; $24,2 \pm 2,2$ cm). As coletas foram realizadas na chegada (0 hora), 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Os níveis de cortisol não apresentaram diferença estatística, mas foi observado um claro perfil de aumento nos valores do cortisol após o transporte acompanhado por uma queda progressiva, vindo a alcançar valores inferiores ao controle com 48, 72 e 96 horas após a operação. A glicose apresentou valores elevados após transporte retornando aos valores basais em 72 horas. Os níveis de lipídeo muscular apresentaram aumento após o transporte retornando a valores próximos aos normais em 72 horas. Triglicérides séricos não apresentaram muitas alterações, já colesterol e a proteína tiveram aumento. Entre os indicadores osmoregulatórios o cloreto teve redução após transporte, bem como o hematócrito, número de células vermelhas e hemoglobina.

Palavra Chave: Transporte, pintado, cortisol, glicose, proteína, lipídeos.

Abstract

Live fish transport is among the most common procedures in fish farming. It is a stressful procedure, responsible for several physiological and metabolic responses caused by a series of stimulus that can lead to significant losses. The aim of this work was evaluate stress responses of juvenil of pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) transported for 12 h in a closed system. A total of 60 fish (66.6 ± 18.3 g; 24.2 ± 2.2 cm) were used. Samplings were performed at arrival (0 h), 24, 48, 72 and 96 h after transport. Blood cortisol levels did not show significant differences but there was a clear profile of increase after transport and gradual reduction after the procedure, reaching levels below the control levels at 48, 72 and 96 h. Glucose was elevated after transport returning to control levels within 72 h. Muscle lipid increased after transport and returned to control levels within 72h. Serum triglicerid did not alter folowing a clear profile and cholesterol and protein increased after transport. Regarding ionic indicators, chloride levels decreased after transport, as well as hematocrit, number of erythrocytes and hemoglobin.

Key-words: Transport, pintado, cortisol, glucose, protein, lipids.

Introdução

O transporte de peixes vivos está entre um dos manejos mais comuns dentro de um sistema de criação e vêm crescendo, pelo aumento das atividades de produção, de comercialização de peixes e alevinos, nos pesque-pagues, nas instituições de pesquisa e para repovoamentos.

Os peixes são transportados de várias maneiras em diferentes veículos, desde pequenos tanques ou outros recipientes, no porta-malas de um carro ou até em caminhões com tanques especiais (Shepherd e Bromage, 1988), o que redobra a necessidade de estudos sobre técnicas, densidades e tempos de transporte mais adequados. O tempo de transporte e o tamanho dos animais transportados variam muito com a distância e a finalidade. Algumas vezes estes animais chegam ao destino em péssimas condições e podem morrer durante o transporte ou algum tempo depois. O transporte pode reduzir a capacidade dos peixes de tolerar a ação de um segundo agente estressor, como uma densidade de estocagem inadequada e prolongada (Specker e Schreck, 1980; Schreck, 2000). Assim, cuidados durante o procedimento de transporte e na preparação do ambiente de recepção dos peixes são muito importantes (Urbinati e Carneiro, 2004; Takahashi et al., 2006).

Ao serem transportados os animais são afetados por uma série de agentes estressores: captura, confinamento, manuseio e o próprio transporte (Urbinati e Carneiro, 2004). A qualidade da água (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia, dióxido de carbono) deve ser adequadamente controlada (Berka, 1986; Ross e Ross, 1999; Emata, 2000). O cuidado com a densidade é de grande importância (Carneiro e Urbinati, 2002; Carneiro et al., 2009), e um dos principais precursores do estresse é a abrasão mecânica causada pelo inevitável contato entre os peixes quando a densidade é elevada (Ross e Ross, 1999).

Segundo Grottum et al. (1997) e Wedemeyer (1997), o principal fator de sucesso da operação de transporte é utilizar a maior densidade de peixes no menor volume de água possível, sem que haja mortalidade, deterioração da qualidade da água e estresse dos animais. A quantificação do estresse ao qual o peixe é submetido durante o transporte é fundamental para que se estabeleçam práticas de manejo adequadas (Wedemeyer, 1997).

Alguns trabalhos têm sido realizados com objetivo de conhecer melhor as respostas fisiológicas e metabólicas de algumas espécies submetidas ao transporte

(Carneiro e Urbinati, 1998; Gomes et al., 2003; Fagundes e Urbinati, 2008), assim como para testar a eficácia de técnicas de transporte que minimizem os efeitos causados pelo estresse, como a restrição alimentar, que visa diminuir o consumo de oxigênio e a excreção de amônia e gás carbônico (Tucker, 1985; Grottum et al., 1997), diferentes densidades (Carneiro e Urbinati, 2002, Urbinati et al., 2004; Adamante et al., 2008; Carneiro et al., 2009) o uso de sal (Carneiro e Urbinati, 2001a; Gomes et al., 2003), uso de anestésicos (Blasiola, 1977; Mcavoy e Zaepfel, 1997; Carneiro e Urbinati, 2001b; Urbinati e Carneiro, 2001; Inoue et al., 2005), vitamina C (Okamura et al., 2007) e sulfato de cálcio (Bendhack e Urbinati, 2009).

Por ser considerado um procedimento traumático, o transporte é responsável por inúmeras reações fisiológicas e metabólicas, devido a uma sucessão de estímulos adversos, podendo levar a perdas consideráveis ou até mesmo a perda de todo o lote. As respostas de estresse mais comumente utilizadas para a determinação da perda da homeostasia dos peixes são as respostas alteradas da liberação de cortisol, alterações metabólicas, iônicas e hematológicas (Wenderlaar Bonga, 1997; Urbinati e Carneiro, 2004).

As pesquisas sobre os efeitos de estressores na prática da criação de peixes brasileiros ainda são recentes (Carneiro e Urbinati, 1998; Barcellos et al., 1999; Carneiro e Urbinati, 2001b; Gomes et al., 2003; Urbinati e Carneiro, 2004; Bendhack e Urbinati, 2009), especialmente com o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Lima et al., 2006; Fagundes e Urbinati, 2008), espécie de alto valor econômico no Brasil. Em estudo prévio realizado com a espécie, Fagundes e Urbinati (2008) relataram que as respostas fisiológicas deste peixe apresentam perfil distinto dos observados na maioria das espécies durante estresse crônico, refletindo aspectos do metabolismo energético. Quando o pintado foi exposto a estressores de longa duração (transporte de 12 horas e exposição à luz e escuridão por 24 horas), houve redução acentuada do cortisol sérico e glicose plasmática, além dos valores basais, sugerindo retroação negativa prolongada da secreção do cortisol e uso preferencial de outros substratos energéticos que não a glicose, para suprir a demanda de energia na correção do distúrbio homeostático do estresse, apontando, desta forma, necessidade de mais estudos para elucidar este comportamento metabólico.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar respostas fisiológicas e bioquímicas (hormonal, metabólicas, iônicas e hematológicas) do pintado quando submetido a estresse de transporte por um período de 12 horas em sistema fechado.

Material e Método

Um total de 60 exemplares de pintado, com peso médio de $66,6 \pm 18,3$ g e comprimento médio $24,2 \pm 2,2$ cm, foi distribuído aleatoriamente em 15 caixas pretas de polietileno de 60L (4 animais por caixa), cobertas com sombrite, com sistema de renovação de água e aeração constantes e fotoperíodo natural (14L:10E). Os peixes permaneceram nestas condições por um período de aproximadamente dois meses (setembro-outubro de 2007) para adaptação, que foi considerada quando os animais começaram a se alimentar regularmente. A temperatura média da água das caixas foi de $28,1 \pm 0,16$ °C, oxigênio dissolvido $5,89 \pm 0,17$ mg/mL, e pH $8,17 \pm 0,07$. Os animais foram alimentados com ração comercial (40% de proteína bruta) uma vez ao dia entre as 18:30 e 19 horas.

Depois de aclimatados, os peixes permaneceram sem alimento por 24 horas. O transporte teve duração de 12 horas. Os animais foram embalados em 13 sacos plásticos de 20 litros com 4L de água (4 animais por embalagem) e adicionado dois terço de oxigênio e devidamente amarrados e acondicionados em caixas de papelão protegidos da luz. A temperatura da água de transporte foi de 28,7°C. Um grupo de nove animais não foi submetido nenhum manejo e foi utilizado como controle.

No término do transporte foram aferidos os seguintes parâmetros físicos e químicos da água das embalagens de transporte: temperatura ($28,9 \pm 0,57$ °C), concentração de oxigênio dissolvido ($18,4 \pm 1,53$ ng/mL), pH ($6,79 \pm 0,08$) e concentração de amônia total ($6,03 \pm 1,84$ mg/L). As coletas de material biológico foram realizadas nos tempos zero (chegada), 24, 48, 72 e 96 horas após a chegada. Na primeira coleta, foram amostrados nove animais (um animal de cada embalagem), o restante foi acondicionado em 14 caixas pretas de polietileno de 60 L (três animais por caixa), onde permaneceram até as amostragens posteriores, sendo amostrados três caixas por coleta (n=9). Os animais que permaneceram nas caixas voltaram a se alimentar 48 horas após o transporte. Para coleta do material os peixes foram sedados com benzocaína 75 mg/L antes de qualquer manipulação.

Amostragem e métodos de análise

Os animais tiveram o sangue coletado por punção do vaso caudal. Uma alíquota foi separada em microtubos contendo 15µL EDTA e fluoreto de potássio, para análise

de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e contagem de células vermelhas (RCB) (Celm CC 550). Uma amostra foi centrifugada (3000 rpm por 10 min a 4°C) para obtenção de plasma e análise de glicemia (Kit Labtest). O restante do sangue foi colocado em outro microtubo e ficou em repouso por duas horas para separação do soro, o qual foi congelado para posterior análise de cloreto (kit Labtest), osmolaridade (Vapor Pressure Osmometer WESCOR), proteína total (Kit Labtest), colesterol (Kit Labtest), triglicerídeos (Kit Labtest) e cortisol (Radioimunoensaio – kit DSL).

Após coleta do material biológico, foi realizada a eutanásia dos animais, os quais foram pesados, medidos e tiveram fragmento de músculo branco da região lateral do corpo removido para posterior análise de lipídeo total (Bligh e Dyer, 1959) e glicogênio muscular (Moon et al., 1989).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Duncan, com nível de 5% de significância.

Resultados

Os valores do cortisol sérico não apresentaram diferença estatística, mas foi possível observar um comportamento de aumento na chegada do transporte e declínio com o passar do tempo, durante a recuperação dos peixes (20,8; 17,5; 13,58; 10,0 e 7,7 ng/mL à 0, 24, 48, 72 e 96 horas respectivamente), chegando a valores inferiores ao do controle (16,8 ng/mL) (Figura 1).

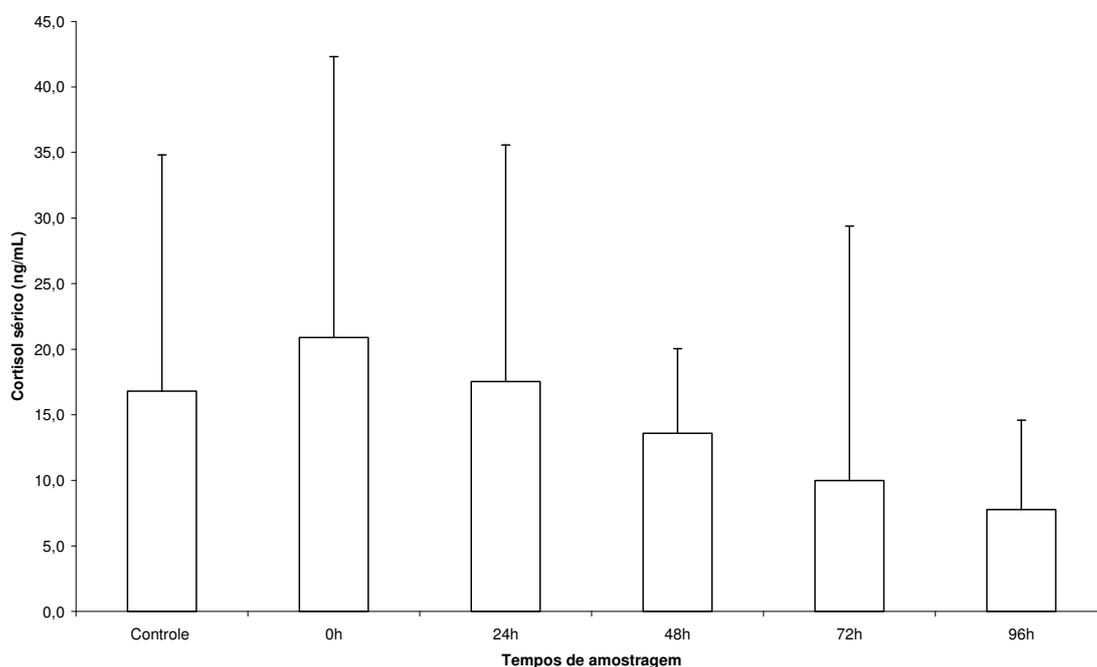


Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=5).

Os valores de glicose plasmática aumentaram significativamente no tempo 0 (chegada - 48,3 mg/mL) em relação aos demais valores. O grupo controle apresentou os valores mais baixos que não diferiram dos valores obtidos 72 e 96 horas (30,3 e 31,1 mg/mL), sendo que as concentrações observadas às 96 horas não diferiram em relação ao observado às 24 e 48 horas (33,4 e 36,5 mg/mL) (Figura 2).

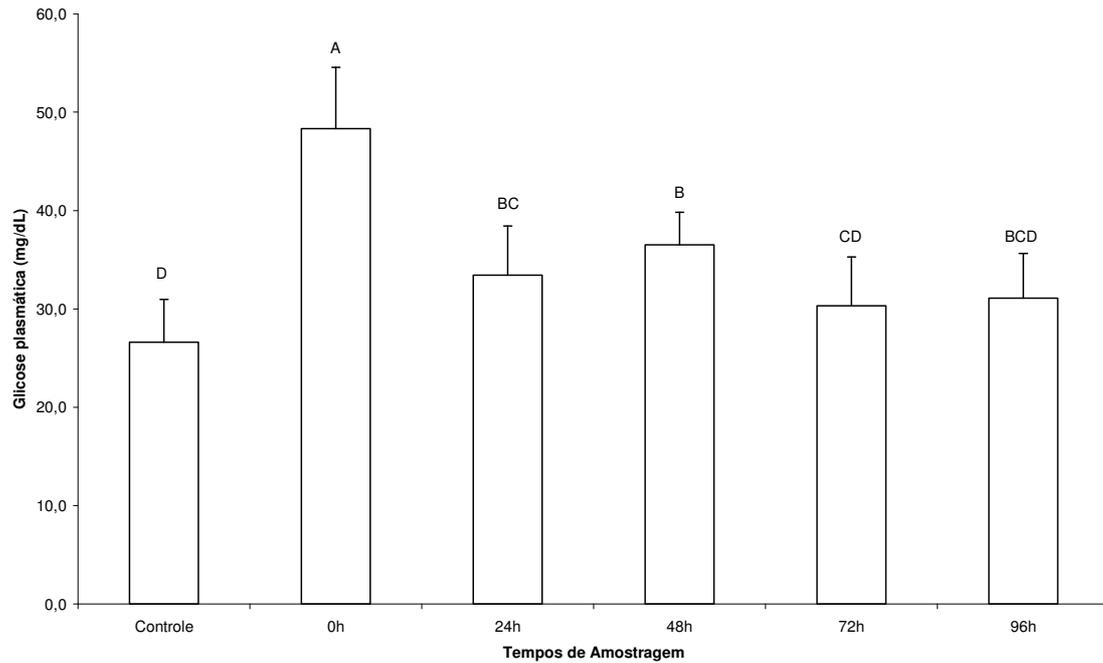


Figura 2: Glicose plasmática (mg/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Duncan).

Os níveis de cloreto sérico apresentaram valores mais altos no grupo controle (132,5 mEq/L), o qual diferiu de todos os outros tratamentos. O menor valor foi encontrado às 24 horas (116,1 mEq/L), que não diferiu dos valores de 72 e 96 horas (120,5 e 120,9 mEq/L). Estes, por sua vez, não diferiram do que foi observado as 0 e 48 horas (125,9 e 123,8 mEq/L) (Figura 3).

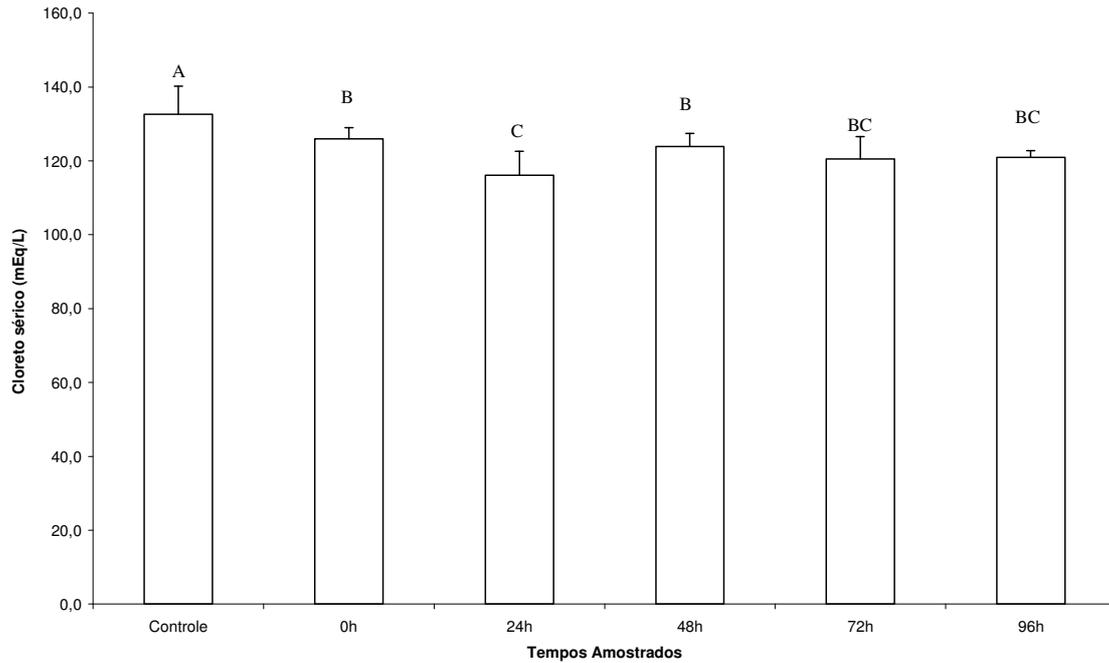


Figura 3: Cloreto sérico (mEq/L) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).

A osmolaridade sérica não diferiu significativamente entre as diferentes coletas, ou seja, controle, zero, 24, 48, 72 e 96 horas (251,1; 251,2; 248,1; 231,7; 242,7 e 243,1 mmol/kg, respectivamente), embora seja possível observar uma redução nos valores registrados as 48 e 72 horas (Figura 4).

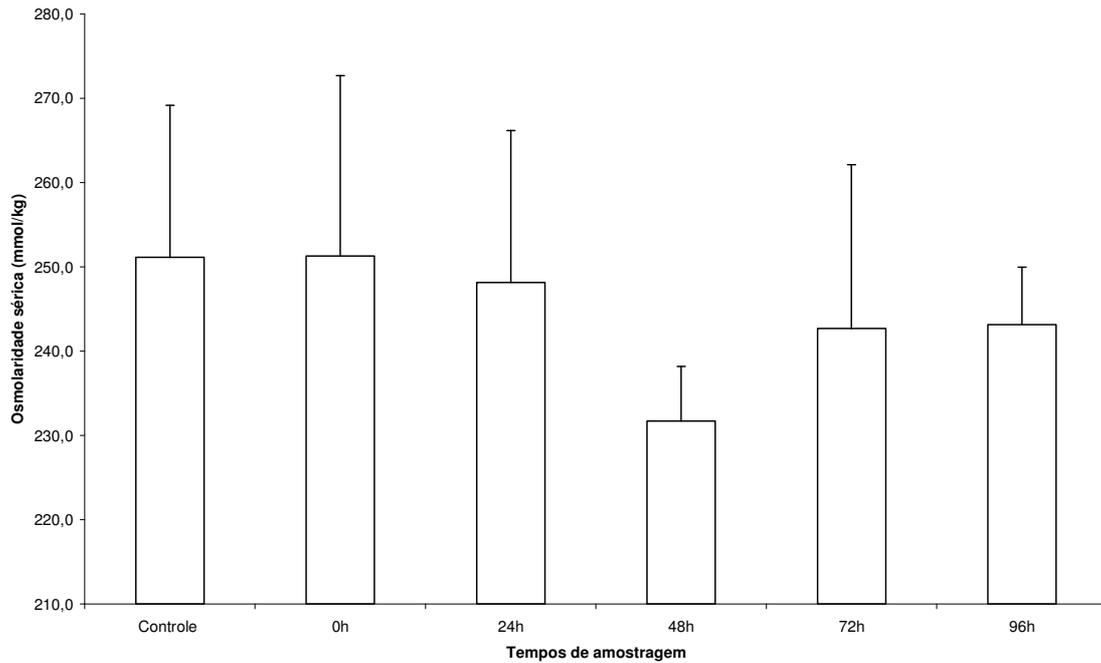


Figura 4: Osmolaridade sérica (mmol/kg) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9).

As concentrações de proteína total sérica aumentaram nas coletas realizadas as zero, 24, 48 e 72 horas (3,1; 3,1; 3,0 e 2,9 g/dL, respectivamente), sendo significativamente menor no grupo controle (2,6 g/dL). Houve uma redução significativa às 96 horas (1,4 g/dL) em relação a todos os outros grupos (Figura 5).

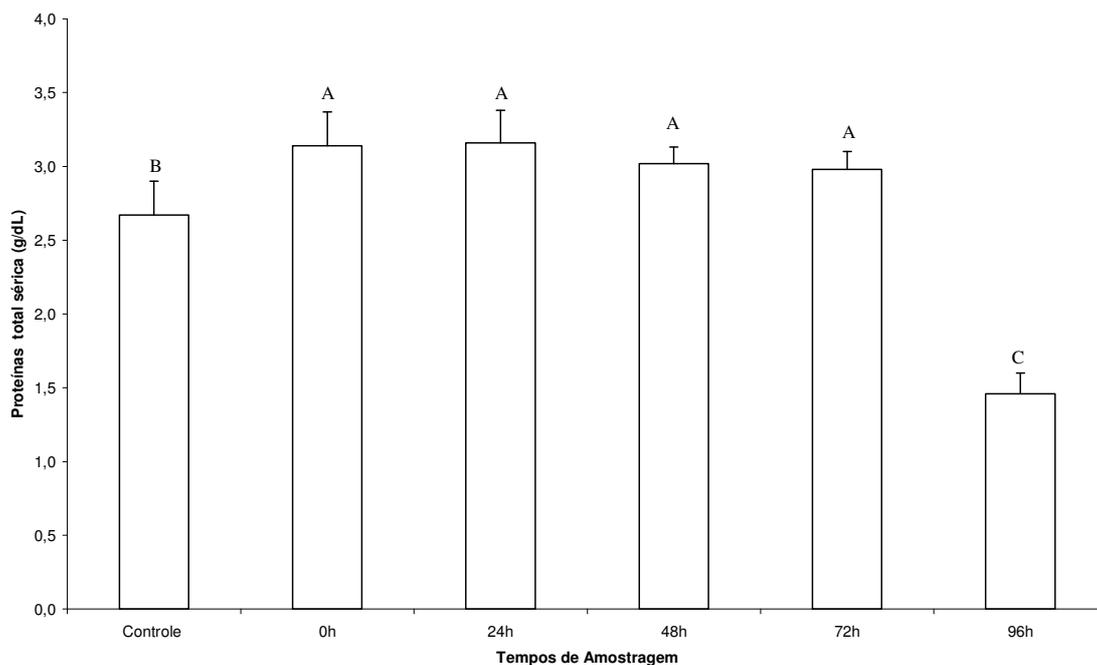


Figura 5: Proteína total sérica (g/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Duncan).

As concentrações de colesterol sérico tiveram aumento significativo a zero e 24 horas (115,6 e 108,9 g/dL), que não foram diferentes estatisticamente das registradas às 48 e 72 horas (103,2 e 103,9 g/dL). O menor valor foi observado no grupo controle (86,4 g/dL), o qual, embora numericamente mais baixo, não diferiu do valor registrado na coleta de 96 horas (92,9 g/dL). Este, por sua vez, foi estatisticamente semelhante às concentrações observadas as 48 e 72 horas (Figura 6).

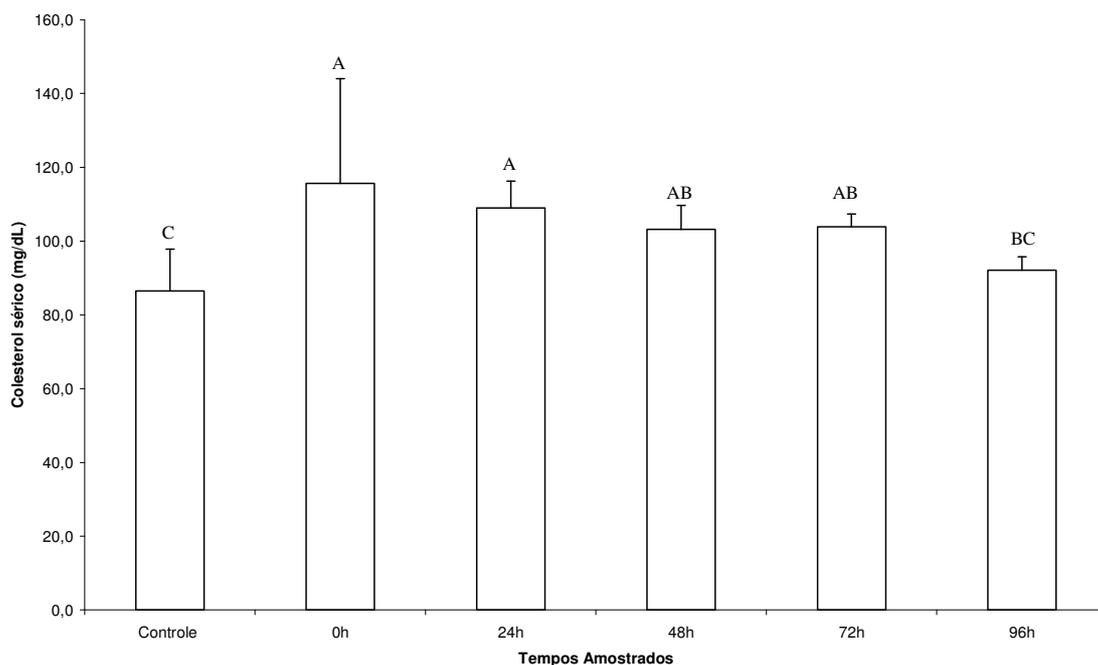


Figura 6: Colesterol sérico (mg/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Duncan).

As concentrações de triglicérides séricos apresentaram valores mais altos nas coletas feitas as 24 e 72 horas (148,4 e 174,9 mg/dL, respectivamente), enquanto se observou uma relativa constância nos valores do grupo controle e nas coletas de zero, 24 e 48 horas (140,9; 128,8; 148,4 e 137,28 mg/dL, respectivamente) (Figura 7).

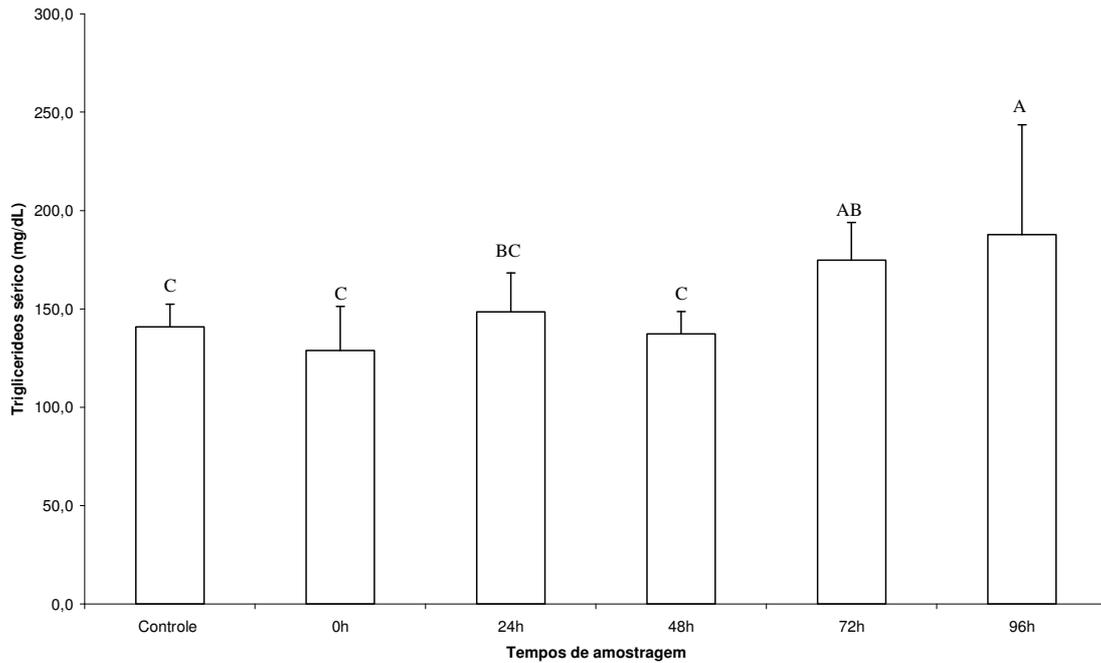


Figura 7: Triglicéridos séricos (mg/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).

As concentrações de lipídio total do músculo branco apresentaram aumento significativo no tempo zero hora (0,6 %), que não foi diferente dos valores obtidos nas coletas de 48, 72 e 96 horas (0,4; 0,4; 0,3 %, respectivamente). O menor valor médio foi registrado às 24 horas (0,08 %), mas este não diferiu do valor do grupo controle (0,1 %), que por sua vez não diferiu das coletas de 48, 72 e 96 horas (Figura 8).

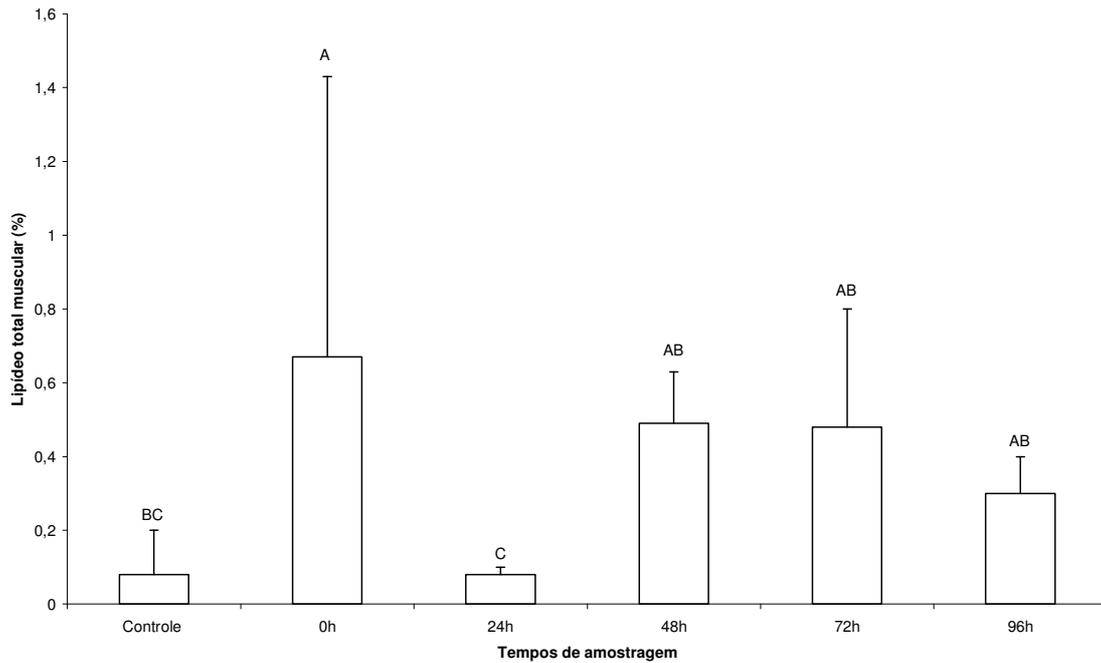


Figura 8: Lípido total muscular (%) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).

As concentrações de glicogênio e lipídeo muscular foram muito baixas e estavam abaixo dos limites de detecção dos métodos utilizados, não sendo possível registrá-las. As análises de glicogênio e lipídeo hepático não puderam ser realizadas por falta de material.

Dentre os parâmetros hematológicos, o hematócrito aumentou significativamente 24, 48 e 72 horas após o transporte (24,4; 23,48 e 22,35 %, respectivamente). Os valores mais baixos foram registrados no grupo controle, zero e 96 horas (18,6; 17,5 e 17,2 %, respectivamente) (Figura 9).

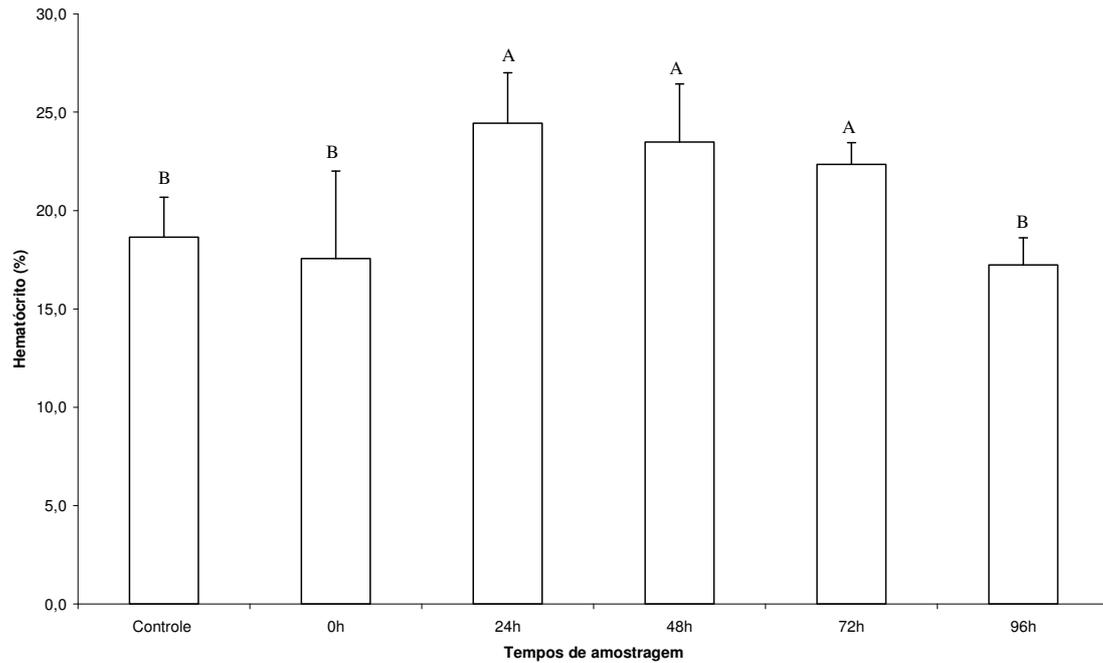


Figura 9: Hematócrito (%) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Duncan).

O número de células vermelhas (RCB) apresentou aumento significativo 24, 48 e 72 horas após transporte (2,3; 2,5; 2,5 e 2,4 $10^6/\text{mm}^3$), mas que não foi diferente do controle (2,3 $10^6/\text{mm}^3$). Os menores valores foram registrados no 0 e 96 horas (2,0 e 2,0 $10^6/\text{mm}^3$, respectivamente) (Figura 10).

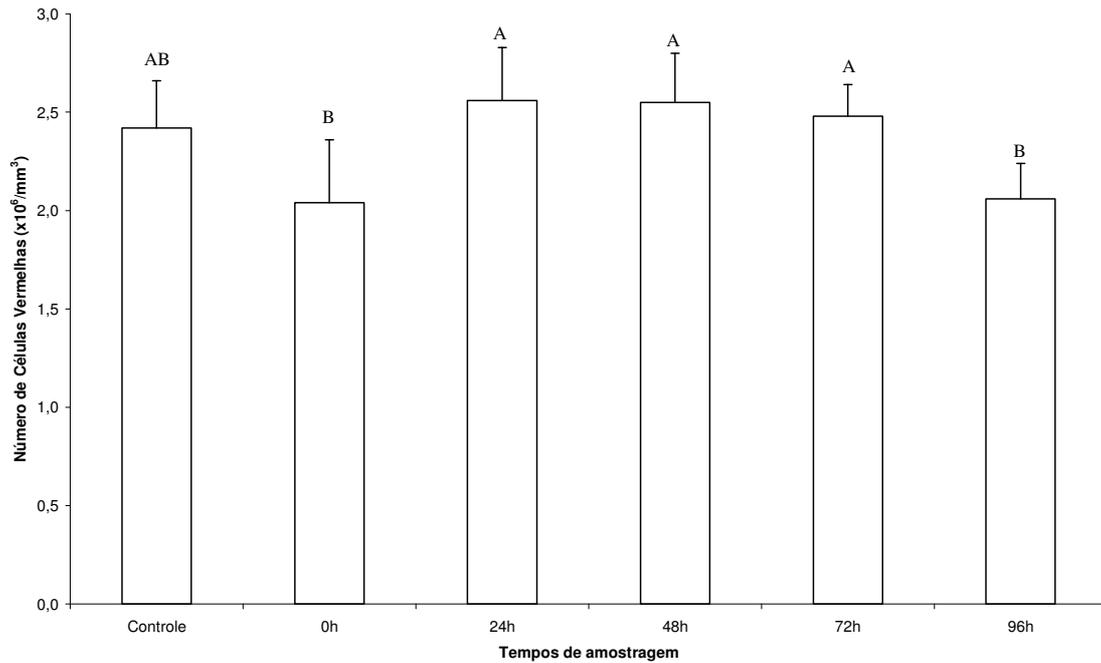


Figura 10: Número células vermelhas ($10^6/\text{mm}^3$) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Duncan).

O volume corpuscular médio (VCM) apresentou aumento significativo 24 horas após o transporte ($96,5 \mu^3$), e uma redução no grupo controle ($79,4 \mu^3$), mas estes valores não diferiram dos valores obtidos nas amostragens de 0, 48 e 96 horas ($84,9$; $85,9$; $82,4$ e $83,5 \mu^3$) (Figura 11).

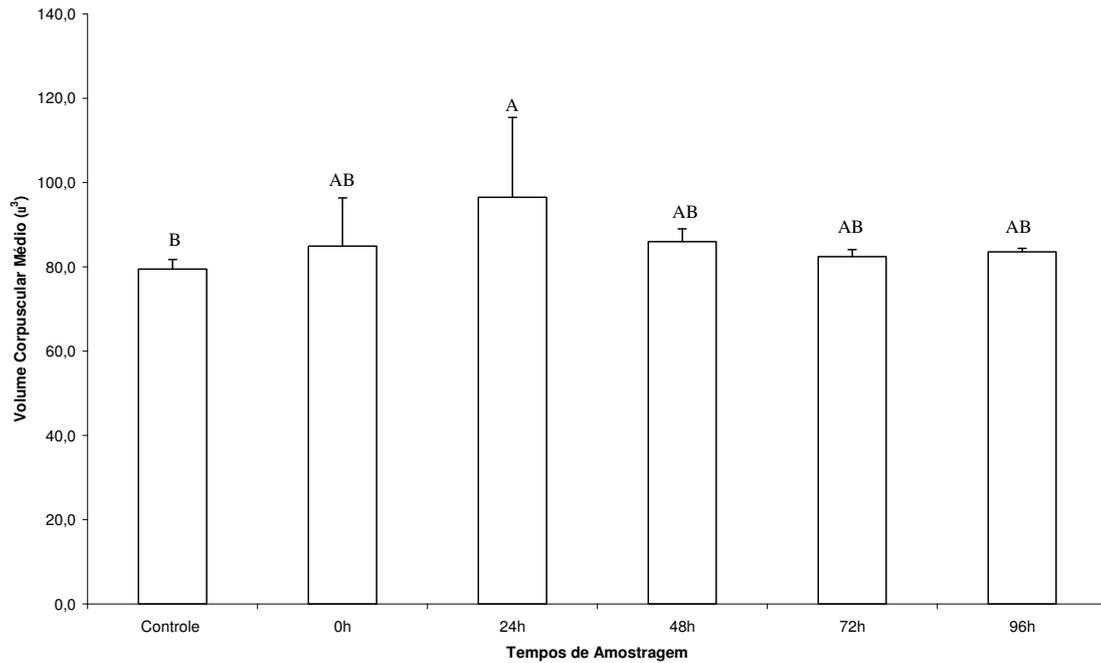


Figura 11: Volume corpuscular médio (μ^3) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Duncan).

As concentrações de hemoglobina apresentaram valores mais altos nos tempos 24, 48 e 72 horas (7,4; 7,4 e 7,7 g/dL, respectivamente). O menor valor foi registrado às 96 horas (6,1 g/dL), mas este não diferiu dos valores do grupo controle e da coleta de zero hora (6,4 e 6,4 g/dL) (Figura 12).

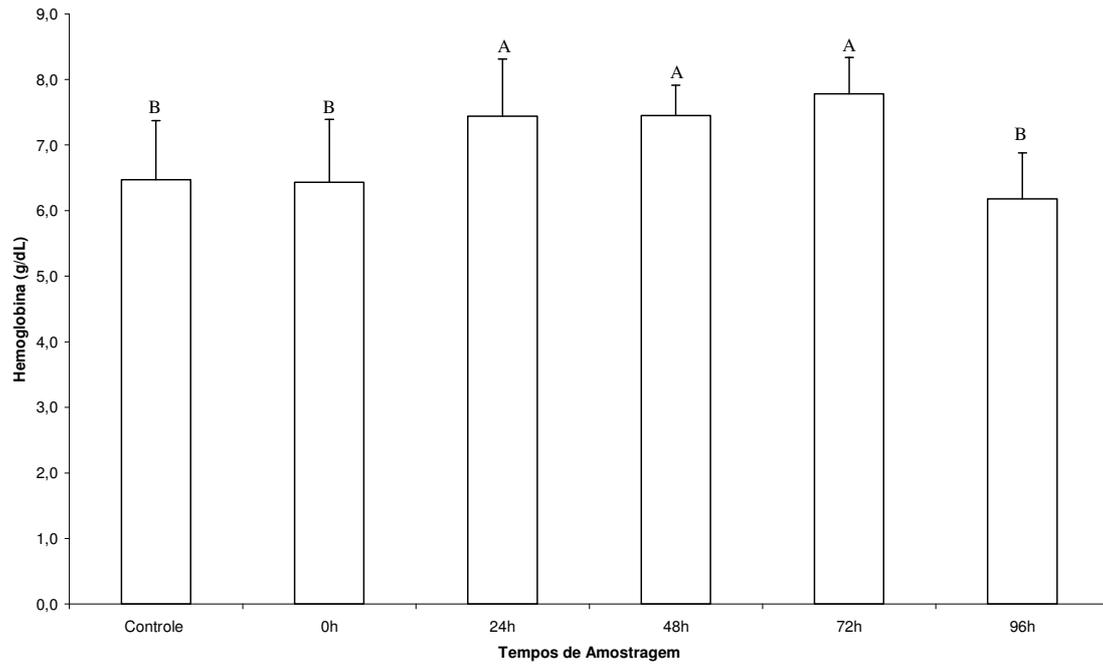


Figura 12: Hemoglobina (g/dL) de pintados transportados em sacos plásticos por 12 horas. Controle – sem transporte; 0 hora – logo após transporte, 24, 48, 72 e 96 horas após o transporte. Valores são médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Duncan).

Discussão

O presente estudo, assim como estudo anterior sobre transporte de pintado (Fagundes e Urbinati, 2008), mostrou que este procedimento é um processo estressante para a espécie, como tem sido para outras (Carneiro e Urbinati, 2001; Gomes et al., 2003; Urbinati et al., 2004; Takahashi et al., 2006; Abreu et al., 2008; Carneiro et al., 2009), podendo levar a alterações fisiológicas e metabólicas clássicas da respostas de estresse (Barton e Iwama, 1991; Wendeelar Bonga, 1997).

Os valores de cortisol sanguíneo têm sido bastante utilizados para identificar a intensidade do estresse em peixes (Barton e Iwama, 1991; Wendeelar Bonga, 1997). O perfil da resposta do cortisol é bastante variado até mesmo para uma mesma espécie (Urbinati e Carneiro, 2004), do mesmo modo que o tempo de retorno a valores considerados controle também são variados e diferem de espécie para espécie. Matrinxãs submetidos ao transporte em diferentes densidades por quatro horas apresentaram um aumento nos níveis de cortisol após o transporte retornando aos valores do controle em 24 horas (Abreu et al., 2008). Salmões submetidos ao transporte apresentaram aumento do cortisol após transporte, mas não retornaram as condições basais em 48 horas (Iversen et al., 1998). Jundiás (*Rhandia quelen*) transportados em diferentes densidades, por um período de quatro horas, apresentaram elevação nos níveis séricos de cortisol após o transporte, na maior densidade, em relação ao controle, sendo que a recuperação ocorreu em 24 horas (Carneiro et al., 2009). No presente estudo os níveis de cortisol não apresentaram diferença estatística, mas foi observado um claro perfil de aumento nos valores do cortisol após o transporte acompanhado por uma queda progressiva, vindo a alcançar valores inferiores ao controle com 48, 72 e 96 horas após o manejo. O estudo anterior com transporte de pintado havia mostrado esse perfil de redução até 48 horas, sugerindo exaustão do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal como resultado da hiperatividade do sistema e incapacidade de compensação nesse período. O presente estudo confirma esse perfil que se estende até 96 horas após o transporte.

Com relação à glicose sanguínea, os peixes do presente estudo apresentaram um aumento significativo nos níveis de glicose plasmática logo após o transporte (zero hora, chegada), confirmando a resposta metabólica secundária do estresse, e a glicose como fonte de energia para a demanda aumentada dos peixes por ação direta no fígado (Mazeaud e Mazeaud, 1981; Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999), resposta

encontrada também em outros estudos sobre transporte de peixes (Carneiro e Urbinati, 2001b; Gomes et al., 2003; Urbinati et al., 2004; Brandão et al., 2006; Takahashi et al., 2006; Abreu et al., 2008; Carneiro et al., 2009). Os valores de glicemia só retornaram aos valores basais 72 horas após transporte. Para mesma espécie e condição experimental, Fagundes e Urbinati (2008) encontraram perfil diferente, onde os valores glicêmicos apresentaram uma redução na chegada. Entretanto, comparando os valores basais de glicemia nos dois experimentos, observa-se que no experimento anterior os peixes controle tinham glicemia em torno de 140 mg/dL, que poderia caracterizar um padrão sazonal ou uma situação de estresse já existente. No presente estudo, os valores controle não chegavam a 30 mg/dL e os valores de pico foram de 50 mg/dL. Uma condição semelhante nos dois estudos foi à demora na recuperação dos valores alterados da glicemia que poderia ser um indicador do aproveitamento de outras fontes de energia pelo pintado, tais como lipídeos ou proteína, considerando o hábito alimentar carnívoro da espécie.

Analisando-se os indicadores metabólicos estudados, observa-se que os estoques de glicogênio e lipídeo do fígado eram tão baixos que não puderam ser registrados pelos métodos utilizados, enquanto que o lipídeo muscular aumentou após o transporte, voltando a valores próximos ao controle com 24 horas. O redirecionamento de fonte energética para uso do músculo pode ser um indicativo de importância desta fonte para o pintado. Os níveis de ácidos graxos poderiam confirmar esse uso, mas o estudo não determinou esse metabólito. Os outros lipídeos analisados foram os triglicérides séricos que não mostraram muita alteração e cujo aumento a partir de 72 horas pode ser indicativo da ingestão de alimento, que foi restabelecida 48 horas após o transporte. Os níveis séricos de colesterol aumentaram após o transporte e pode ser associado ao aumento do cortisol já que o colesterol é precursor para a síntese dos hormônios esteróides (Wedemeyer, 1970). No caso da proteína sérica, houve um aumento após o transporte que se manteve até 72 horas, reduzindo a valores inferiores ao controle em 96 horas. Assim como o colesterol, este aumento pode estar associado ao aumento de cortisol, visto que este esteróide é transportado na corrente sanguínea por proteínas específicas (Mommensen et al., 1999).

Distúrbios osmoregulatórios podem ser induzidos pelo estresse e cada espécie de peixe tem a capacidade de regular às concentrações internas de seus fluídos dentro de certos limites, sendo uma característica do estresse à extrapolação destes limites (McDonald e Milligan, 1997). A elevação nos níveis de adrenalina induz o aumento da

permeabilidade do epitélio das brânquias à passagem da água, levando a mudança nos níveis de eletrólitos sanguíneos em ambientes hiper ou hipotônicos (Cech, et al. 1996). Sabe-se que o cortisol tem ação sobre a regulação iônica em teleósteos, juntamente com outros hormônios, como as catecolaminas e a prolactina (Eddy, 1981).

Os níveis de cloreto sérico estavam reduzidos após o transporte, a valores que permaneceram até 96 horas após transporte, sugerindo perda iônica do sangue para o meio externo hipotônico, possivelmente por efeito do aumento da perfusão nas brânquias ocasionada por ação adrenérgica na circulação sanguínea (Eddy, 1981; Cech et al., 1996; McDonald e Milligan, 1997). Resultados semelhantes de redução após transporte foram encontrados para mesma espécie (Fagundes e Urbinati, 2008), para matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Carneiro e Urbinati, 2002; Abreu et al., 2008), para pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Matrinxã tiveram recuperação nos níveis de cloreto 24 horas depois da chegada do transporte (Carneiro e Urbinati, 2001ab e Urbinati et al., 2004).

Segundo Morgan e Iwama (1997), os parâmetros hematológicos também são utilizados como indicadores de estresse em peixes. As mudanças no hematócrito durante respostas de estresse indicam hemoconcentração ou hemodiluição devido aos distúrbios osmorregulatórios. Os animais transportados tiveram aumento do hematócrito 24, 48 e 72 horas após o transporte, que foi acompanhado pelo aumento no número de células vermelhas e hemoglobina, sugerindo tentativa do organismo de buscar maior aporte de oxigênio para maximizar o uso do substrato energético oxidativo. Salmão Atlântico (*Salmo salar* L.) submetido ao transporte também apresentaram aumento nos valores do hematócrito (Iversen, et al., 1998). Fagundes e Urbinati (2008) ao submeterem juvenis de pintado ao transporte por 12 horas encontraram aumento no hematócrito 12 e 24 horas após transporte que foi acompanhado pela elevação no número de células vermelhas e concentração de hemoglobina. Já juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a estresse crônico apresentaram diminuição nos valores do hematócrito e do número de células vermelhas (Barcellos et al., 2004).

Conclusão

Pode-se verificar que os animais transportados apresentaram alterações metabólicas, osmoregulatórias e hematológicas compatíveis com um quadro de estresse, como já se era esperado. Os resultados sugerem também, que esta espécie parece utilizar outra fonte de energia, que não a glicose para suprir as necessidades energéticas em situações estressantes.

Bibliografia

ABREU, J.A. de; SANABRIA-OCHOA, A.I.; GONÇALVES, F.D.; URBINATI, E.C. Stress responses of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p. 1413-1417, 2008.

ADAMANTE, W.B.; NUÑER, A.P.O.; BARCELLOS, L.J.G.; SOSO, A.B.; FINCO, J.A. Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and time of transportation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60. n.3 p.755-761, 2008.

BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWISKY, S.; SOUZA, S.M.G.; LULHIES, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v.30, n.6, p.437-445, 1999.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ L.C.; QUEVEDO R.M.; FIOREZE I.; CERICATO, C.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R.K.; BRUSCHI A.; RITTER, F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 383-394, 2004.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Diseases**, Vancouver, v.10, p.3-26, 1991.

BENDACK, F.; URBINATI, E.C. Calcium sulfate as stress reducer in matrinxã (*Brycon amazonicus*) transportation. **Journal of Applied Ichthyology**, v.25, p.105-109, 2009.

BERKA, R. The transport of live fish. A review. **EIFAC Technical Papers 48**. FAO. Rome, Italy, 1986.

BLASIOLA Jr., G.C. Quinaldine sulfate, a new anaesthetic formulation for tropical marine fishes. **Journal of Fish Biology**, v.10, p.113-119, 1977.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L. de C.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazônica**, v.36, n.3, p. 349-356, 2006.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATTI, E.C. Alterações metabólicas, hematológicas e osmoregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causados pelo estresse de transporte. **Anais do Aquicultura Brasil'98**. Recife, v.2. p.609-620, 1998.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. **Aquaculture Research**, v.32, p.297-304, 2001a.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Plasma electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. **Journal of Applied Aquaculture**, v.11, n.4, p.1-13, 2001b.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) at different densities. **Aquaculture International**, v.10, p.221-229, 2002.

CARNEIRO, P.C.F.; KAISELER, P.H.S.; SWAROFSKY, E.A.C.; BALDISSEROTTO, B. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.2, p. 283-288, 2009.

CECH, Jr.J.; BARTHOLOW, S.D.; YOUNG, P.S.; HOPKINS, T.E. Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. **Transactions of the American Fisheries Society**, 1996, v.125, p. 308-320, 1996.

EDDY, F.B. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed.). **Stress and fish**. Academic Press, p.77-102, 1981.

EMATA, C. Live transport of pond-reared milkfish *Chanos chanos* forskal broodstock. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.31, p.279-282, 2000.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v.276. p.112-119, 2008.

GOMES, L.C.; LIMA, C.A.R.M.A.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. Avaliação dos efeitos de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.2, p.283-290, 2003.

GROTTUM, J.A.; STAURNES, M.; SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L), kept at high during transport. **Aquaculture Research**, v.28, p.159-164, 1997.

INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. Effects of clove oil on stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v.35, n.2, p.289-295, 2005.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; NILSSEN, K.J. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. **Aquaculture**, v. 168, p. 387-394, 1998.

LIMA L.C.; RIBEIRO, L.P.; MALISON, J.A.; BARRY, T.P.; HELDJ.A. Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of surubim *Pseudoplatystoma sp.* **Journal of the World Aquaculture Society**, v.37, n.1, p.89-95, 2006.

McAVOY, S.E.; ZAEPFEL, R.C. Effects of tricaine methanesulfonate (MS-222) on hematocrit: first field measurements on blacknose dace. **Transactions of American Fisheries Society**, v.126, p.500-503, 1997.

MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed), **Stress and fish**. Academic Press, p. 49-76, 1981.

McDONALD, D.G.; MILLIGAN, L. **Ionic**, osmotic and acid-base regulation in stress
In Iwama, G.W., A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck, editors. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p. 119-144, 1997.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN. M.M., T.W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.

MOON, T.W., FOSTER, G.D., PLISETSKAYA, E.M. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. **Canadian Journal of Zoology**, v.67, p.2189-2193, 1989.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.W. et al. (Edt) **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University Press, cap. 10, p.247-270, 1997.

OKAMURA, D.; ARAÚJO, F.G.; LOGATO, P.V.R.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, R.T.F., ARAÚJO, R.V. Efeitos da vitamina C sobre o hematócrito e a glicemia de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.883-888, 2007.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Blackwell Science, Oxford, UK. 1999.

SHEPHERD, C.J.; BROMAGE, N.R. **Intensive fish farming**. Oxford, BSP Professional Books. 1988. p.502.

SCHRECK, C.B. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In **The Biology of Animal Stress**, Moberg, G.P.; Mench, J.A. (Eds.). 2000. CAB International.

SPECKER, J.L.; SCHRECK, C.B. Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.37, p.765-769, 1980.

TAKAHASHI, L.S.; ABREU, J.S.; BILLER, J.D.; URBINATI, E.C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.28, p.469-475, 2006.

TUCKER, C.S. **Channel catfish**. Elsevier, Amsterdam, p. 957, 1985.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.16, n1, p.75-85, 2001.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de Manejo e Estresse dos Peixes em Piscicultura Intensiva. In **Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical**. Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Castagnolli, N. (Eds.). p. 171-193, 2004. Editora TecArt. SãoPaulo.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S., LANDINES, M.A. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v.229, p.389-400, 2004.

WEDEMEYER, G.A. Stress of anaesthesia with MS-222 and benzocaína in trout (*Salmo Gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canadá**, v.27, p. 909-914, 1970.

WEDEMEYER, G.A. Effect of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge, Cambridge University Press, 1997. p. 35-71. (Society for Experimental Biology Seminar Series, 62).

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

CAPÍTULO IV

O fotoperíodo e sua importância na fisiologia do pintado (*Pseudoplatystoma
corruscans*)

Resumo

Poucos são os estudos avaliando o efeito da luminosidade ou do fotoperíodo em respostas de estresse em peixes nativos. Em geral, esses estudos abordam outros aspectos da criação. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) quando submetido à luz contínua (24L:0E) e a escuridão total (0L:24L) por um período de 24 horas. Foram utilizados 66 juvenis de pintado com peso e comprimento médio de $70,15 \pm 18,2$ g e $25,28 \pm 2,18$ cm, distribuídos em 33 caixas (n=6). As coletas do material biológico foram realizadas ao término das 24 horas de exposição (0 hora), 24, 48, 72 horas e 1 semana após. Os níveis séricos de cortisol não foram diferente estatisticamente, embora os valores dos animais submetidos à luz contínua fossem numericamente mais elevados em relação aos que permaneceram em total escuridão e ambos reduzidos em relação ao controle. A glicemia, não apresentou diferença estatística embora tenha sido reduzida nos animais mantidos em ambiente escuro. Não foi observado alteração osmorregulatória e o hematócrito, número de células vermelhas e concentração de hemoglobina mostraram o mesmo perfil, tendendo ser maiores nos peixes expostos ao ambiente com luz constante. Os resultados sugerem que o pintado, espécie que apresenta hábitos noturnos, apresenta resposta fisiológica moderada às mudanças do fotoperíodo.

Palavras Chave: Pintado, cortisol, fotoperíodo, glicemia, luz, escuro.

Abstract

Few studies have been evaluating the effect of photoperiod on stress of native fish. The aim of this study was to assess physiological responses of pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submitted to continuous light (24L:0D) and darkness (0L:24D) during 24 h. A total of 66 juvenile fish (70.15 ± 18.2 g and 25.28 ± 2.18 cm) were distributed in 33 boxes (n=6). Samplings were performed at the completion of the 24h photoperiod exposure (zero hour), 24, 48, 72 horas and one week after. Blood cortisol did not differ statistically but in fish submitted to continuous light values were numerically higher compared to those of fish submitted to darkness and both compared to control. Blood glucose did not show statistical difference but lower levels had been seen in fish under darkness. No osmorregulatory disturbance was seen. Hematocrit, number of red cells and hemoglobin showed the same profile trending to be higher in fish exposed to continuous light. Results suggest that pintado, nocturnal species, presents moderate responses to the photoperiod changes.

Introdução

A aquicultura é uma atividade com maior representatividade na produção de proteína de origem animal, que gera receita de milhões de dólares para vários países (Bezerra et al., 2008). Desde 1970, esta atividade vem crescendo com média de 9,2% ao ano, superando a produção de outros animais que cresce apenas 2,8% ao ano (Assad, 2004).

Atualmente o Brasil é considerado o país com maior potencial para o desenvolvimento da aquicultura no mundo, pelo clima quente o ano todo, na maior parte do país, a abundância de recursos hídricos, as grandes safras de grãos e a grande diversidade de espécies com potencial para criação, dentre as quais se destaca o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e o cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) (Rotta e Gonda, 2004).

O pintado pertence à família dos Siluriformes e é amplamente conhecido como surubim. É uma espécie nativa brasileira cujo cultivo encontra-se em franca expansão (Campos, 2005), embora sua produção ainda seja baixa, ao redor de 1245,5 toneladas, concentrada na região Centro-oeste (IBAMA, 2007). A espécie possui boas características zootécnicas (Gonçalves e Carneiro, 2003), atingindo 2,0 kg/ano, tamanho estabelecido pelo mercado consumidor (Campos, 2005). Sua carne é considerada produto nobre, tanto pelo sabor como pela ausência de espinhos intramusculares, sabor pouco acentuado e baixo teor de gordura (Sato et al., 1997).

O pintado é um peixe de hábito alimentar noturno (Agostinho et al., 2004), e durante o dia permanece em repouso no fundo do rio ou dos ambientes de criação (Campos, 2005). Estudo realizado por Fagundes e Urbinati (2008) mostrou que tanto a exposição à luz contínua quanto à escuridão parecem afetar negativamente a resposta de estresse no pintado.

São poucos os estudos avaliando o efeito da luminosidade ou do fotoperíodo em respostas de estresse em peixes. Em geral, esses estudos abordam outros aspectos da criação. Alguns estudos foram realizados com relação à intensidade luminosa (Stefansson et al., 1993; Duray et al., 1996; Pereira, 2001; Freiden et al., 2006), com cores (Loukashkin e Grant, 1959; Heichenbach-Klinke, 1982; Volpato, 2000; Barcellos et al., 2009) e fotoperíodo (Reynalte-Tataje et al., 2002; Trotter et al., 2003; Bezerra et al., 2008) a fim de avaliar possíveis consequências na criação de peixes.

De acordo com Pereira (2001), muitas espécies eclodem com olhos sem pigmentação, sendo considerados não funcionais, tanto histologicamente como comportamentalmente. Porém, no início da alimentação exógena (captura de alimentos externos), todas as espécies apresentam olhos funcionais, permitindo que a larva comece a capturar alimento. Embora no início da vida a visão seja reduzida, ela melhora com o crescimento do animal. Segundo o mesmo autor, juntamente com a cor, a luminosidade interfere diretamente na captura de alimentos, na sobrevivência e no crescimento de larvas. Algumas espécies, no meio ambiente, apresentam picos de alimentação em horários como no raiar do sol, indicando a necessidade de uma moderada intensidade luminosa.

O fotoperíodo é um dos fatores que apresenta maior influência sobre o biorrítmo dos animais, afetando o ganho de peso, a ingestão de alimentos, o gasto de energia, a atividade de locomoção, dentre outros parâmetros fisiológicos (Biswas e Takeuchi, 2002).

Feiden et al. (2006) relataram que o controle de fatores como luminosidade, fotoperíodo, turbidez e temperatura da água, e utilização de refúgios podem contribuir para a redução do canibalismo em larvas e juvenis. Já ambientes iluminados favorecem a predação (Duray et al., 1996). Larvas de surubim do Iguazu (*Steindachneridion sp.*) apresentaram melhor desenvolvimento, maior sobrevivência e menor taxa de predação em ambientes escuros e sem refúgio (Freiden et al., 2006).

Salmões “chinook” submetidos à simulação de transporte e protegidos da luz apresentaram uma redução de 25% na resposta hormonal de estresse, quando comparados aos não protegidos (Wedemeyer, 1985). Larvas de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) tiveram melhor crescimento e sobrevivência em ambientes com elevada intensidade luminosa e em fotoperíodos de 24L:0E (Puvamendran e Brown, 2002), do mesmo modo, larvas de *Paralichthys lethostigma* (Moustakas et al., 2004) e juvenis de *Melanogrammus aeglefinus* (Trippel e Neil, 2002) tiveram melhor desempenho produtivo quando exposto a 24 horas de luz.

Campagnolo e Nuñez (2008) submeteram larvas de pintado a diferentes fotoperíodos (Luz:Escuro – 0:24, 10:14, 14:10 e 24:0) e observaram que após cinco dias de experimento as respostas de crescimento e sobrevivência dos animais apresentavam relação inversa ao aumento do fotoperíodo. Já entre o 5º e 10º dia, houve uma tendência a maior sobrevivência nos fotoperíodos intermediários, mas foram registrados sobrevivências semelhantes no intervalo entre 0:24 e 14:10 no 10º dia. O maior ganho

de peso foi observado nos períodos intermediários, sugerindo influência do fotoperíodo sobre mudanças durante a criação. Luchiari et al. (2009) testaram o efeito da luz monocromática em juvenis de *Sander lucioperca* e observaram que a presença de comprimentos de onda mais longos no ambiente de criação pode melhorar a eficiência alimentar e o crescimento de peixes.

Segundo Pereira (2001), tanques com larvas de pintado podem ter fundo branco, mas devem ser mantidos em baixa luminosidade, sendo coberto por tela. O mesmo autor também afirma que larvas de tambaqui criadas em tanques de cor verde claro podem apresentar uma sobrevivência sete vezes maior e peso médio 50% maior, do que quando criadas em tanque marrom escuro, sob condições ambientais estressantes.

A maioria dos peixes é sensível à cor, mas não da mesma forma que os humanos e nem todos percebem a mesma faixa espectral. Alguns tipos de trutas possuem três cones (vermelho, verde e azul) semelhantes aos humanos, mas outros peixes como o *Micropterus salmoides*, a perca (*Perca sp*), o “crappie” (*Pomoxis sp*), o “zander” (*Stizostedion lucioperca*), bluegills (*Lepomis macrochirus*) e o “walleye” (*Sander vitreus*) possuem apenas dois cones pigmentados (vermelho e verde), já carpas apresentam quatro tipos de cones vermelho, verde e azul além de um para detecção da luz ultravioleta. (Jones, 2006).

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar algumas respostas fisiológicas de estresse do pintado submetido à luz e ao escuro por um período de 24 horas.

Material e Método

Foram utilizados 66 juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com peso e comprimento médio de $70,15 \pm 18,2$ g e $25,28 \pm 2,18$ cm, respectivamente. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 33 caixas pretas de polietileno de 60 L (dois animais por caixa), sem sombrite, com sistema de circulação de água constante e aeração. A temperatura média foi de $27,1 \pm 0,25$ °C, oxigênio dissolvido $6,5 \pm 0,19$ mg/mL. Antes de iniciar o experimento, os animais foram expostos a um regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão durante sete dias, nas mesmas unidades experimentais. Os animais foram alimentados com ração comercial (40% de proteína bruta) uma vez ao dia entre as 18:30 e 19 horas, até adaptação que foi considerada quando os animais começaram a se alimentar regularmente.

Depois de aclimatados, todos os animais permaneceram em jejum de 24 horas antes da realização do experimento, onde foram expostos às diferentes condições de luminosidade. Um grupo foi exposto à luz contínua (lâmpadas fluorescentes de 1200 lux, medido com luxímetro na superfície das caixas) e outro grupo permaneceu em total escuridão por um período de 24 horas, enquanto um grupo foi mantido nas mesmas condições da aclimação (12L:12E), sendo considerado o grupo controle. Ao término das 24 horas todos os animais voltaram a regime de 12L:12E.

Após o término do período de exposição as diferentes luminosidades, os peixes foram amostrados às 0 horas (ao findar às 24 horas de exposição) 24, 48, 72 horas e 1 semana depois, sendo coletado três caixas (n=6). Os animais foram anestesiados com benzocaína (75 mg/L) para coleta de material biológico e realização da biometria.

Amostragem e métodos de análise

O sangue dos peixes foi coletado por punção do vaso caudal. Uma alíquota foi separada em microtubos contendo 15µL EDTA e fluoreto de potássio, para análise de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e contagem de células vermelhas (RCB) (Celm CC 550). Uma amostra foi centrifugada (3000 rpm por 10 min a 4°C) para obtenção de plasma e análise de glicemia (Kit Labtest). O restante do sangue foi colocado em outro microtubo e ficou em repouso por um período de duas horas para separação do soro, o qual foi congelado para posterior análise de cloreto (kit

Labtest), osmolaridade (Vapor Pressure Osmometer WESCOR) e cortisol (Radioimunoensaio – kit DSL).

Após coleta do material biológico, os animais foram pesados e medidos, antes de retornarem às caixas de recuperação até as amostragens seguintes.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 5 + 1$, composto por dois fatores (luz e escuridão), cinco tempos de amostragem (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana) e testemunha. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA, utilizando-se o programa SAS. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

Resultados

Na ausência de diferença significativa nos parâmetros analisados entre os regimes de luz e os tempos de coletas os dados foram agrupados.

Os valores de cortisol sérico não apresentaram diferenças estatísticas, embora haja uma diferença numérica entre os animais expostos a luz contínua (13,6 ng/mL) e os que permaneceram em total escuridão (9,6 ng/mL). Nos demais tempos coletados (0, 24, 48, 72, 96 e 1 semana), com exceção de um valor mais alto na coleta de uma semana, observa-se uma relativa constância entre as concentrações de cortisol (10,7; 10,2; 11,8; 10,7; 17,0 e 19,6 ng/mL, respectivamente) (Figura1).

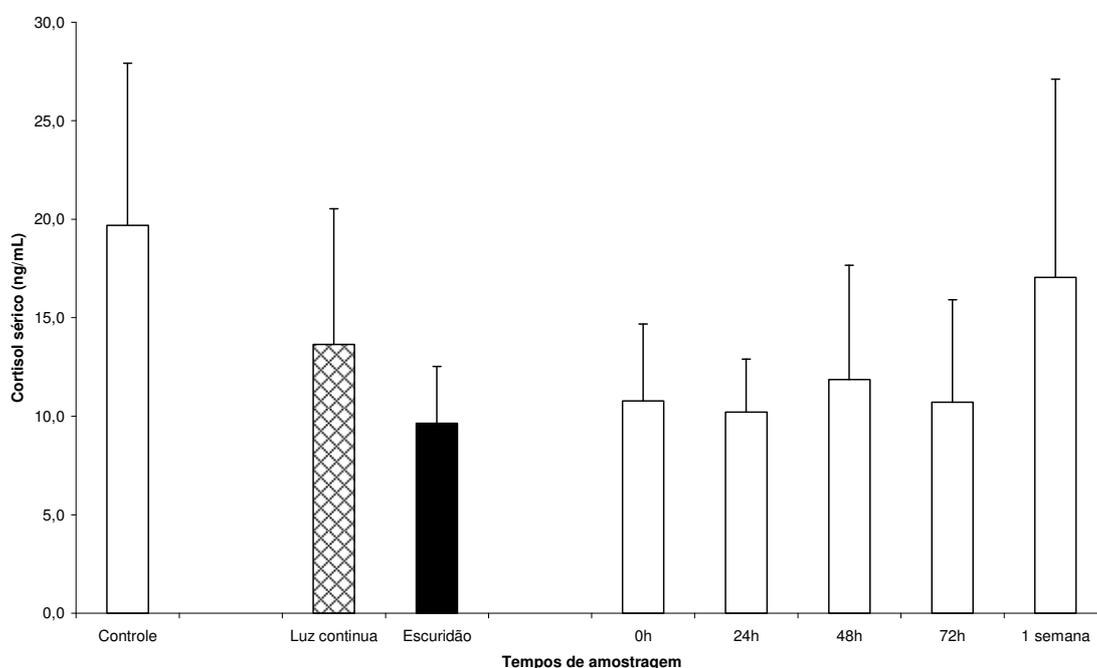


Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição a diferentes luninosidades (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois).. Valores são médias \pm DP (n=5).

Os níveis de glicose plasmática não foram estatisticamente diferentes em relação aos níveis registrados em condições de luz contínua e escuridão (35,9 e 33,7 mg/dL) e os tempos de coletas 0, 24, 48, 72 horas e 1 semana entre si (32,9; 36,6; 32,3, 33,6 e 38,1 mg/dL, respectivamente) e em relação ao controle (33,5 mg/dL) (Figura 2).

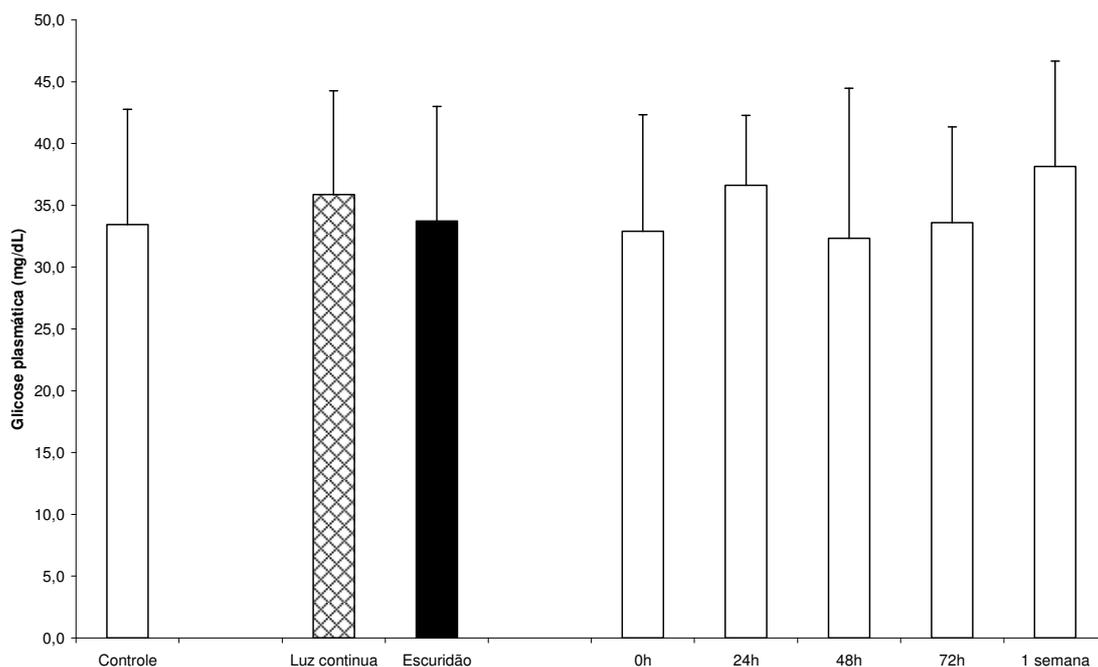


Figura 2: Glicose plasmática (mg/dL) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6).

Os níveis de cloreto plasmático não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos níveis obtidos em condições de luz contínua e escuridão (120,1 e 120,9 mEq/L). Também não houve diferença entre os tempos das coletas de 0, 24, 48, 72 horas e 1 semana (115,5; 114,6; 119,8; 125,6, 126,1 mEq/L, respectivamente) e o grupo controle (109,0 mEq/L) (Figura 3).

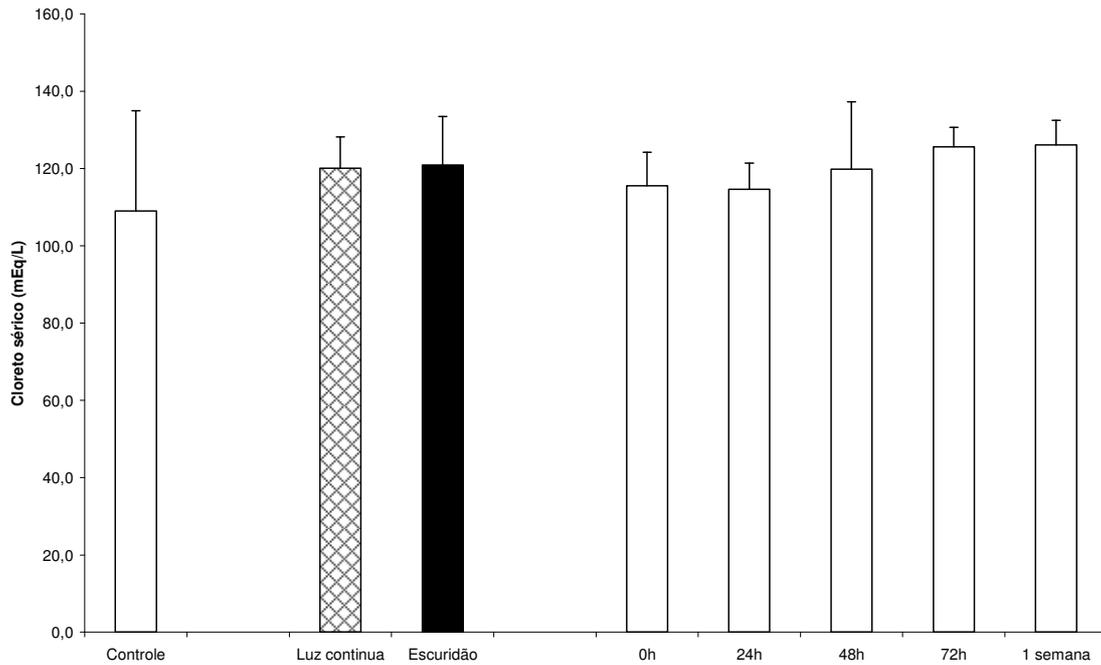


Figura 3: Cloreto sérico (mEq/L) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois).. Valores são médias \pm DP (n=6).

A osmolaridade sérica não apresentou diferença estatística quando comparadas as condições de luz contínua e escuro (244,9 e 263,7 mmol/kg) e os tempos de coleta 0, 24, 48, 72 horas e 1 semana (271,9; 257,3; 234,5; 256,3 e 255,5 mmol/kg) e controle (252,2 mmol/kg) (Figura 4).

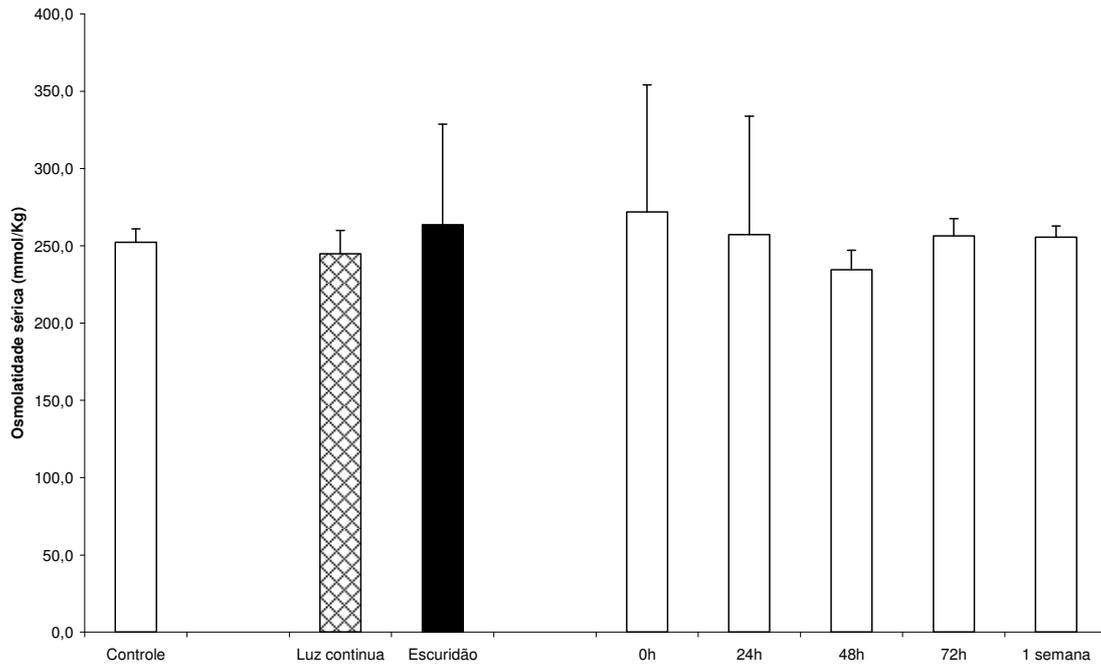


Figura 4: Osmolaridade sérica (mmol/kg) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6).

Dentre os parâmetros hematológicos, o hematócrito não apresentou diferença estatística quando comparadas as condições de luz contínua e escuridão (28,1 e 25,5%), independente do tempo de coleta, mas apresentou um aumento significativo quando comparados os tempos de coleta, independente do tratamento aplicado aos peixes. O maior valor foi registrado às 24 horas (30,8%) e o menor às 72 horas (23,3%), embora ambos não fossem estatisticamente diferentes dos valores registrados 0, 48 horas e 1 semana depois (24,0; 29,8 e 25,9 %). Não houve diferença também em relação ao grupo controle (23,9 %) (Figura 5).

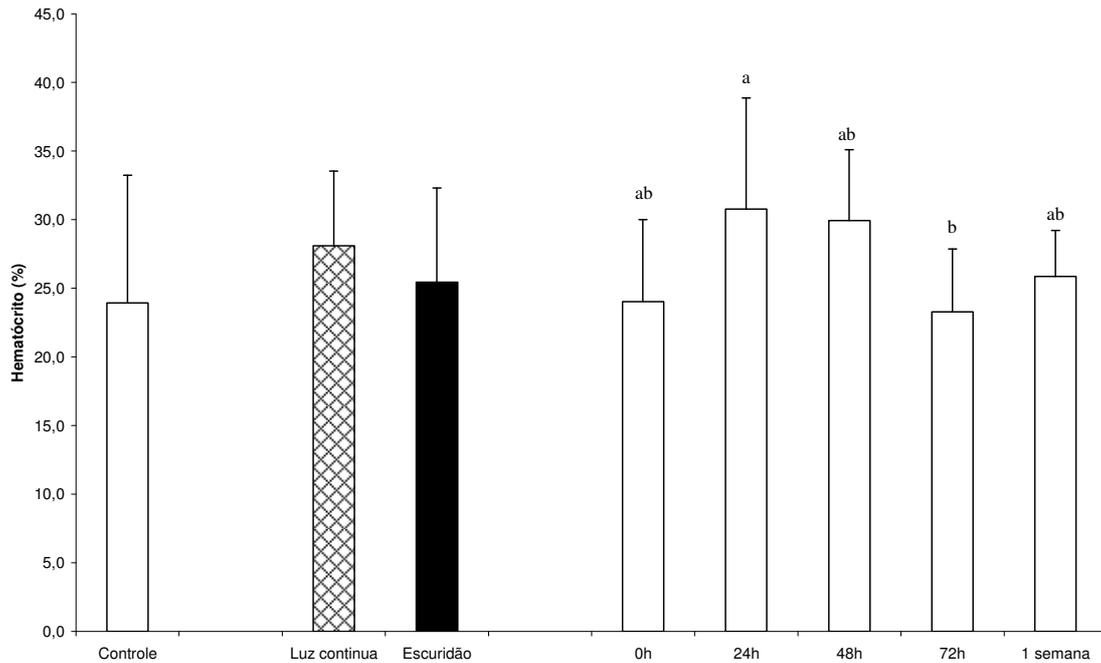


Figura 5: Hematócrito (%) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05, teste de Tukey).

O número de células vermelhas (RCB) não apresentou diferença entre as condições de luz contínua e escuridão ($3,0$ e $2,7 \cdot 10^6/\text{mm}^3$), mas apresentou aumento uma semana após os tratamentos ($3,3 \cdot 10^6/\text{mm}^3$), que não foi diferente estatisticamente dos valores de 24 e 48 horas ($3,2$ e $3,0 \cdot 10^6/\text{mm}^3$). Houve redução às 72 horas ($2,3 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) em relação aos valores obtidos a zero e 48 horas ($2,5$ e $3,0 \cdot 10^6/\text{mm}^3$), sem diferença em relação ao grupo controle ($2,3 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) (Figura 6).

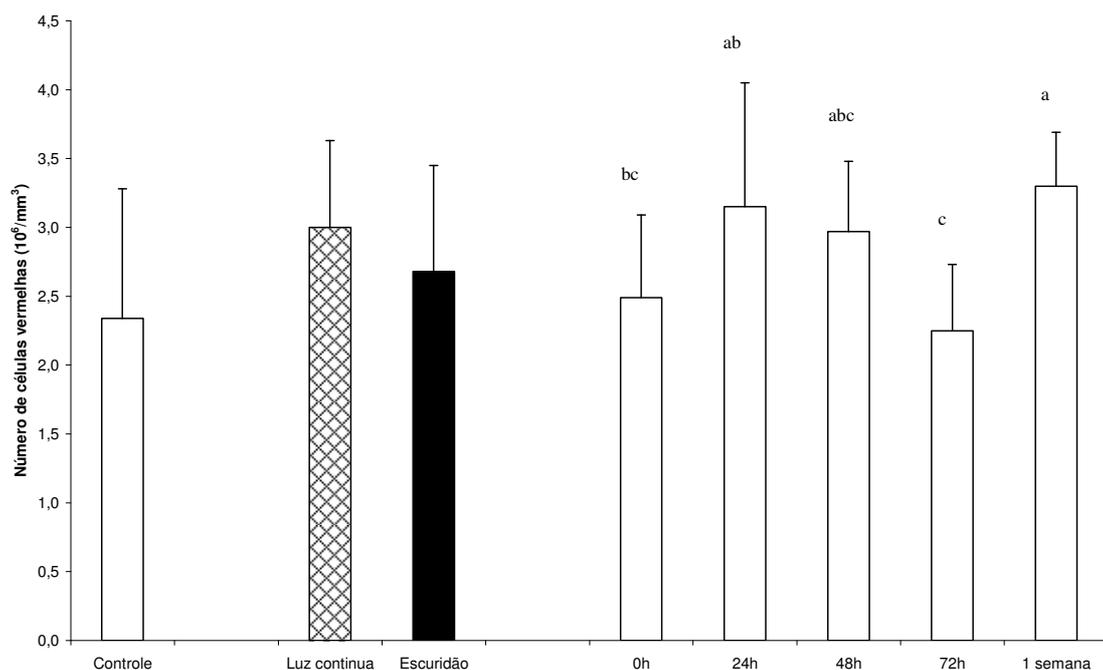


Figura 6: Número de células vermelhas ($10^6/\text{mm}^3$) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP ($n=6$). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P<0,05$, teste de Tukey).

O volume corpuscular médio (VCM) apresentou aumento significativo quando comparadas as condições de luz contínua e escuridão ($94,5$ e $97,1\mu^3$). Já em relação aos tempos de amostragem, houve um aumento significativo às 72 horas ($103,9\mu^3$) com relação a 0, 24 horas ($98,2$ e $98,6\mu^3$), mas ambos não apresentaram diferença em relação aos valores de 48 horas ($100,7\mu^3$). Houve redução significativa após 1 semana ($78,3\mu^3$) em relação a todas as coletas anteriores. Quando comparados ao grupo controle ($103,1\mu^3$), tanto os dados obtidos após exposição à luz contínua e à escuridão, como os dados obtidos na coleta de 1 semana ($94,5$; $97,1$ e $78,3\mu^3$, respectivamente) apresentaram diferenças estatísticas (Figura 7).

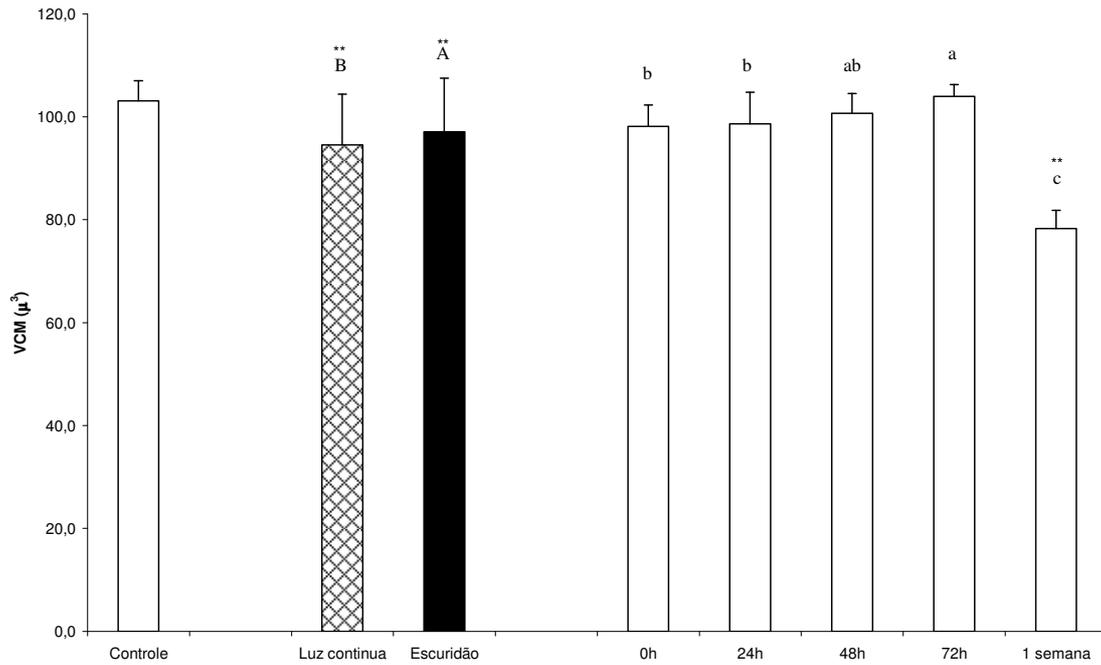


Figura 7: Volume corpuscular médio (μ^3) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Tukey). * e ** indicam diferença significativa em relação à testemunha a 5 e 1 %, respectivamente.

Os valores de hemoglobina nos peixes expostos a luz contínua foram maiores que nos peixes mantidos na escuridão independente do tempo de coleta (9,5 e 7,9 g/dL, respectivamente). Em relação aos tempos de amostragem, houve flutuações, sendo que os valores registrados a 0 e 72 horas (7,3 e 7,0 g/dL) foram significativamente mais baixos em relação aos valores obtidos após 1 semana (10,3 g/dL), mas sem significância em relação a 24 e 48 horas (9,6 e 9,4 g/dL). Nenhum grupo apresentou diferença quando comparado ao controle (7,6 g/dL) (Figura 8).

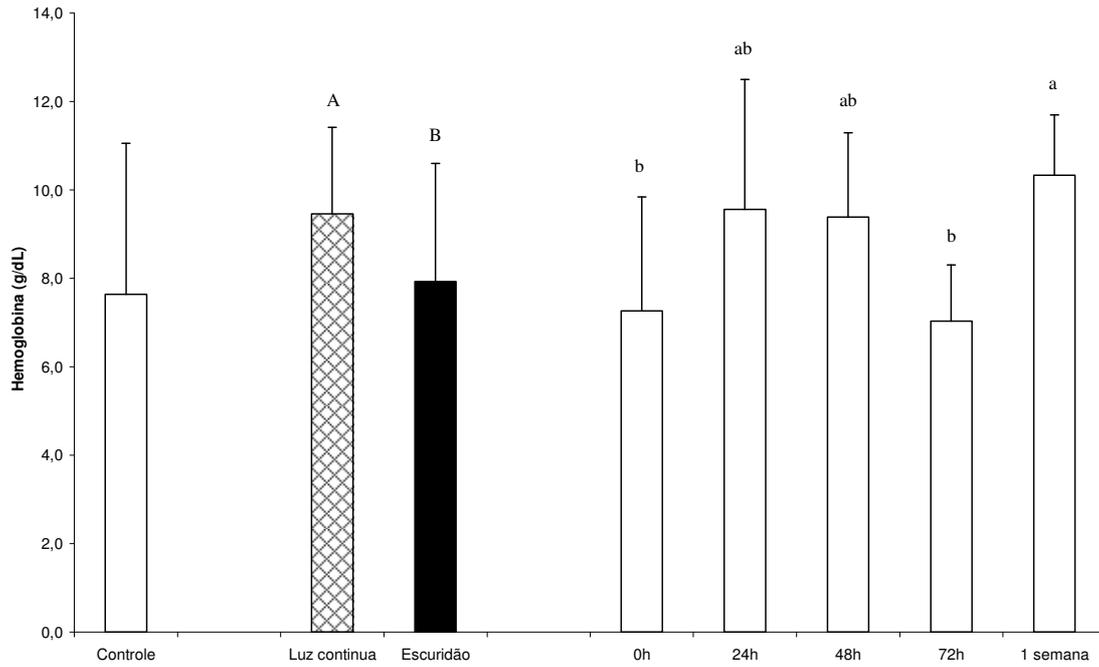


Figura 8: Hemoglobina (g/dL) de pintados submetidos à exposição contínua de luz e escuridão por 24 horas, após a exposição ao estressor (0, 24, 48, 72 horas e 1 semana depois). Valores são médias \pm DP (n=6). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Tukey).

Discussão

A maioria dos peixes são predadores visuais e precisam de um mínimo de intensidade luminosa para crescer normalmente (Boeuf e Le Bail, 1989). Muitos fatores afetam a estratégia alimentar dos peixes, sendo a luz um dos mais importantes por influenciar a periodicidade dos ritmos biológicos (Biswas e Takeuchi, 2002), como acontece com o Salmão do Atlântico (*Salmo salar*), que apresenta maior consumo de alimento e crescimento quando exposto a dias longos (Stefansson et al., 1989). Existem, também, peixes com atividade noturna que se alimentam e crescem melhor em completa escuridão como o *Salvelinus alpinus* (Jorgensen e Jobling, 1989) e a maioria dos bagres (Burton, 1996). Por outro lado, a luz pode interferir em respostas de estresse (Wedemeyer, 1985) e no comportamento agressivo dos peixes (Almazán-Rueda et al., 2005) e na taxa de canibalismo, como observado para o bagre africano (Pienaar, 1990).

No presente estudo, juvenis de pintado foram expostos por 24 horas à luz contínua e a escuridão total, mas não se observou alteração significativa nos níveis séricos de cortisol, embora os valores nos animais submetidos à luz contínua fossem numericamente mais altos em relação aos que permaneceram em total escuridão e ambos reduzidos em relação aos peixes que passaram pelo ciclo de claro e escuro. Em estudo anterior (Fagundes e Urbinati, 2008), juvenis da mesma espécie foram submetidos a esquema de iluminação semelhante e os resultados de cortisol tiveram perfis de secreção parecidos, embora, no presente estudo, a exposição foi feita usando uma fonte de 1200 lux e no estudo anterior 435 lux. Adicionalmente, a avaliação pós-exposição aos regimes de luz se prolongou por uma semana enquanto no outro estudo os peixes foram amostrados apenas ao final da exposição de 24 horas. Neste caso, observou-se que os níveis séricos do hormônio só voltaram a valores próximos ao controle, uma semana após retorno às condições normais de fotoperíodo. Em salmões, observou-se uma redução de 25% da resposta hormonal de estresse quando protegidos da luz, em comparação aos não protegidos durante uma simulação de transporte (Wedemeyer, 1985).

No caso do pintado, os valores mais baixos de cortisol sérico foram observados após a exposição dos peixes ao ambiente sem luz, sugerindo que a ausência de luz tem um papel importante no comportamento e no bem estar desta espécie, como também observado em estudo feito com bagre africano (*Clarias gariepinus*) que mostrou que, à medida que as horas de luz aumentavam em um ciclo de 24 horas, os peixes se

tornavam mais agressivos e estressados, em relação a peixes expostos a redução do número de horas de luz. Sob períodos mais longos de exposição à luz, os peixes apresentavam atividade natatória mais intensa, maior agressividade e níveis mais elevados de cortisol. O aumento da luz no ciclo de 24 horas mostrou que os animais ficavam mais agressivos comparados aos expostos a um número reduzido de horas luz. Os animais expostos ao período de 06E:18L apresentaram os maiores valores de cortisol (Almazán-Rueda et al., 2005). No caso de *Pagrus major*, a exposição dos peixes a quatro diferentes fotoperíodos não afetou os níveis plasmáticos de cortisol (Biswas et al., 2006).

No caso da glicemia não houve diferença entre os diferentes tratamentos. No estudo anterior com pintado, embora não houvesse significância na resposta encontrada para essa variável, houve uma redução nos valores de glicose quando os peixes foram mantidos em ambiente escuro. O aumento dos níveis de glicose sanguíneo é um indicador de estresse em peixes (Morgan e Iwama, 1997), mas no caso do pintado o uso deste indicador não sugeriu condição estressante para os peixes.

Os indicadores de distúrbios osmoregulatórios utilizados (cloreto e osmolaridade) também não sugeriram condição de estresse nos peixes, pois não houve diferenças entre os tratamentos, corroborando resultados já relatados para o pintado (Fagundes e Urbinati, 2008).

Os parâmetros hematológicos são utilizados como indicadores de estresse em peixes e indicam estado eritropoiético e necessidade tecidual de energia transportada pelas hemácias. Alterações nas concentrações de hemoglobina sanguínea, no hematócrito e no número de eritrócitos após o estresse podem indicar uma hemoconcentração ou hemodiluição por disfunção osmoregulatória. No presente experimento não se observou alteração osmorregulatória e o hematócrito, número de células vermelhas e concentração de hemoglobina mostraram o mesmo perfil, tendendo ser maiores nos peixes expostos ao ambiente com luz constante. No estudo anterior com pintados submetidos ao mesmo fotoperíodo o aumento do hematócrito, do número de células vermelhas e da concentração de hemoglobina também foram observados, e com significância estatística (Fagundes e Urbinati, 2008). De acordo com Valenzuela et al. (2006), trutas expostas a dois meses de luz constante tiveram aumento do número de eritrócitos, que desapareceu cinco meses após voltar ao fotoperíodo natural. Segundo os autores, o aumento inicial destes parâmetros poderia ser um indicador de necessidades metabólicas dos peixes.

Em *Pagrus major* exposto a diferentes fotoperíodos não se observou alteração no hematócrito (Biswas et al., 2006).

Conclusão

Os resultados mostram que o pintado apresenta moderadas respostas fisiológicas a mudança de fotoperíodo. Pelo fato dos animais que tiveram restrição de luz apresentar uma menor resposta ao estresse, sugere-se que esta espécie sente-se mais confortável em ambientes escuros.

Bibliografia

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO Jr., H.F. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. (Eds). Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries, and Conservation Status. **World Fisheries Trust/World Bank/IDRC**. 2004.

ALMAZÁN-RUDA, P.; VAN HELMOND, A.T.M.; VERRETH, J.A.J.; SCHRAMA, J.W. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v.67, p.1029-1039, 2005.

ASSAD, L.T. Uma visão de futuro: aqüicultura e pesca no Brasil. **Aqüicultura e pesca**, v.1, p.30, 2004.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. **Aquaculture**, v.288, p.51-56, 2009.

BEZERRA, K.S.; SANTOS, A.J.C.; LEITE, M.R.; SILVA, A.M.; LIMA, M.R. Crescimento e sobrevivência de tilápia chitralada submetida a diferentes fotoperíodos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.6, p.737-743, 2008.

BISWAS, A.K.; TAKEUCHI, T. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss on fed and unfed adult tilapia (*Oreochromis niloticus*): part II. **Fisheries Science**, v.68, p.543-553, 2002.

BISWAS, A.K.; SEOKA, M.; TAKII, K.; MAITA, M.; KUMAI, H. Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. **Aquaculture**, v.252, p.566-572, 2006.

CAMPAGNOLO, R.; NUÑER, A.P.O. Survival and growth of *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces Pimelodidae) larvae: effect of photoperiod. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1511-1516, 2008.

CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Eds.). **Espécies nativas com potencial para piscicultura**. Editora UFSM, p.327-343, 2005.

DURAY, M. H.; ESTUDILLO, C.B.; ALPASAN, L.G. The effect of background color and rotifer density on rotifer intake, growth and survival of the grouper (*Epinephelus suillus*) larvae. **Aquaculture**, v.146, p.217-224, 1996.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v.276, p.112-119, 2008.

FREIDEN, A.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R.; REIDEL, A. Desenvolvimento de larvas de *Steindachneridion sp.* em diferentes condições de refúgio e luminosidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.1, p.133-137, 2006.

GONÇALVES, E.G.; CARNEIRO, D.J. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p.779-786, 2003.

HEICHENBACH-KLINKE, H.H. **Enfermedades de los Peces**. Editora Acribia, Zaragoza, Spain. 1982.

IBAMA. **Estatística da Pesca de 2005**. Brasil – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília, 2007. p.147.

JONES, K. **A visão dos peixes**. Berkeley Fish Research Center, Spirit Lake. Iowa, USA.2006. In: “2006 World Record Game Fish” IGFA. Disponível: http://www.katembe2.com/visao_dos_peixes.pdf.

LOUKASHKIN, A.S.; GRANT, N. Behavior and reactions of the Pacific sardine, *Sardinops caerulea* (Girard) under the influence of white and colored lights and darkness. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v.29, p.509-548, 1959.

LUCHIARI, A.C.; FREIRE, F.A.M.; PIRHONEN, J.; KOSKELA, J. Longer wavelengths of light improve the growth, intake and feed efficiency of individually reared juvenile pikeperch *Sander lucioperca* (L.). **Aquaculture Research**, v.40, p.880-886, 2009.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.W. et al. (Edt) **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University Press, p.247-270, 1997.

MOUSTAKAS, C.T.H.; WATANABE, W.O.; COPELAND, K.A. Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival, and osmoregulatory ability of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma*. **Aquaculture**, v.229, p.159-179, 2004.

PEREIRA, M.M. Influência da cor e da luminosidade no cultivo de larvas de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, p.43-47, 2001.

PIENAAR, A.G. **A study of coeval sibling cannibalism in larval and juvenile fishes and its control under culture conditions**. 1990. Dissertação (Mestrado) - Rhodes University, Grahamstown, 1990.

PUVANENDARAN, V.; BROWN, J.A. Foraging, growth and survival of Atlantic cod larvae in different light intensities and photoperiods. **Aquaculture**, v.214, p.131-151, 2002.

REYNALTE-TATAJE, D.; LUZ, R.K.; MEURER, S.; ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, characidae). **Acta Scientiarum**. v.24, n.2, p.439-443, 2002.

ROTTA, M.A.; GONDA, M.F. “Ictioproveta” para a biometria indireta do peso se surubins (pintado e cachara) utilizando seu volume e densidade. **Informativo Técnico Embrapa**. Cuiabá, ISSN 1517-4875, 2004.

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; SALLUM, W.B.; GODINHO, H.P. Indução experimental da desova do surubim *Pseudoplatystoma corruscans*. In: MIRANDA, M.O.T. Surubim. IBAMA. **Coleção Meio Ambiente**, série Estudos Pesca, B. H., v.19, p.69-79, 1997.

STEFANSSON, S.O.; HANSEN, T.J.; TARANGER, G.L. Growth and parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under different light intensities and subsequent survival and growth in seawater. **Aquacultural Engineering**, v.13, p.231-243, 1993.

TRIPPEL, E.A.; NEIL, S.R.E. Effects of photoperiod and intensity on growth and activity of juvenile haddock (*Melanogrammus aelefinus*) light. Fisheries and Oceans. Canada, New Brunswick, St. Andrews Biological Station, 531 Brandy Cove Road, St. Andrews, 2002. In: SALARO, A.L.; LUZ, K.R.; ZUANON, J.A.S.; SIROL, R.N.; SAKABE, R.; ARAUJO, W.A.G; SOUTO, E.F. Desenvolvimento de alevinos de trairão (*Hoplis lacerdae*) na ausência de luz. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.28, n.1 p.47-50, 2006.

TROTTER, A.J.; BATTAGLENE, S.C.; PANKHURST, P.M. Effects of photoperiods and light intensity on initial swimming bladder inflation, growth and post inflation viability in cultured striped trumpeter (*Latris lineatus*) larvae. **Aquaculture**, v.224, n.1-4, p.141-158, 2003.

VALENZUELA, A.E.; SILVA, V.M.; KLEMPAU, A.E. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. **Aquaculture**, v. 251, p.596– 602, 2006.

VOLPATO, G.L. Aggression among farmed fish. In: FLOS, R.; CRESWELL, L. (Eds.) Aqua 2000: Responsible Aquaculture in the New Millennium. **European Aquaculture Society Special Publication**, Nice. n.28, 2000.

WEDEMEYER, G. Development and evaluation of transport media to mitigate stress and improve juvenile salmon survival in Columbia River bagging and trucking operations. **Contract Report to Bonneville Power Administration**, Portland, Oregon, n.82, p.19, 1985.

CAPÍTULO V

Uso de anestésicos para determinação de concentrações apropriadas para anestesia cirúrgica no pintado (*Pseudoplastystoma corruscans*)

Resumo

O crescimento da piscicultura faz com que o número de animais manejados diariamente nas fazendas seja grande, porém estes procedimentos podem ser traumáticos para os animais se realizados inadequadamente. Uma das técnicas utilizadas para minimizar o estresse na manipulação dos peixes tem sido o uso de anestésicos. O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de três diferentes anestésicos (benzocaína, 2-fenoxietanol e eugenol) para o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Os juvenis de pintados foram submetidos a banhos de anestésicos nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L de benzocaína, 0,2; 0,4; 0,8 mL/L de fenoxietanol e eugenol, até atingirem estágio de anestesia cirúrgica. Foram avaliados os níveis séricos de cortisol que não apresentaram diferença estatística para a benzocaína e 2-fenoxietanol, já o eugenol apresentou aumento destes níveis na menor dosagem quando comparada as demais. A glicose plasmática não foi estatisticamente diferente na benzocaína, mas no 2-fenoxietanol e no eugenol apresentaram o mesmo perfil onde os menores valores foram encontrados na maior dosagem. Nos três anestésicos testados, o hematócrito apresentou os maiores valores nas menores dosagens o que foi acompanhado pelo número de células vermelhas e hemoglobina. Os tempos de indução apresentaram o mesmo perfil para os três anestésicos, e as menores concentrações promoveram os maiores tempos. O tempo de recuperação para benzocaína e 2-fenoxietanol não apresentaram diferença estatística, mas o eugenol promoveu os maiores tempos nas concentrações mais altas caindo progressivamente conforme diminuiu a concentração. Todos os anestésicos testados foram eficientes na indução do estágio de anestesia cirúrgica. As concentrações de 75 mg/L de benzocaína e 0,8 mL/L de 2-fenoxietanol e eugenol apresentaram bons tempos de indução e recuperação acompanhados dos menores níveis séricos de cortisol e glicose plasmática.

Palavra chave: Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), benzocaína, 2-fenoxietanol, eugenol, cortisol, anestesia peixes.

Abstract

With the growth of aquaculture, a greater number of fish is handled in the stations, but the farming practice can be traumatic to animals IF it were not done with the appropriate handling. One of the techniques utilized to minimize the fish stress is the use of anesthetics. The aim of this work was to test the efficiency of three anesthetics (benzocaine, phenoxyethanol and clove oil) in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Fish were exposed to three anesthetic (25, 50 and 75 mg/L benzocaine; 0.2, 0.4 and 0.8 mL/L of phenoxyethanol and clove oil). Blood cortisol levels reduced as the eugenol concentration increased, and the same profile was observed with phenoyethanol. No difference was observed regarding benzocaine. Similarly, glucose reduced with the anesthetics increased, being the lower levels found in the lower concentrations of both anesthetics. Similar profile of reduction was seen regarding to benzocaine and eugenol in hematocrit, number of red cells and hemoglobin. In all three anesthetics, the lowest concentrations promoted the higher time of anesthetic induction. The recovery time did not differ between benzocaine and phenoethanol, but colve oil showed the highest times at the highest concentrations. All anesthetics tested induced surgical state of anesthesia and concentrations of 75mg/L benzocaine and 0.8 mL/L 2-phenoxyethanol and clove oil presented appropriate times of anesthetic induction and recovery at the same time of the lowest blood levels of cortisol and glucose.

Key words: Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), benzocaine, 2-phenoxyethanol, clove oil, cortisol, anesthesia, fish

Introdução

A piscicultura é uma atividade em franca expansão no Brasil. O número de animais manejados diariamente nas fazendas é bastante grande, porém nem sempre são empregadas as técnicas de manejo mais adequadas (Inoue e Moraes, 2007). Uma das técnicas usadas para minimizar o estresse dos peixes durante a manipulação é o uso de anestésicos (Ross e Ross, 1999; Griffiths, 2000; Carneiro e Urbinati, 2001b; Urbinati e Carneiro, 2001; Small, 2003; Iversen et al., 2009). Várias são as drogas utilizadas como anestésicos para peixes, entre elas a triclaína metanosulfato (MS-222), a quinaldina, 2-fenoxietanol (Mgbenka e Ejiofor, 1998; Ross e Ross, 1999; Hovda e Linley, 2000), a benzocaína (Gomes et al., 2001; Urbinati e Carneiro, 2001b) e o eugenol (Inoue e Moraes, 2007).

A anestesia é um procedimento reversível que provoca a perda de sensações em todo ou em parte do corpo, e que resulta da depressão da função nervosa, causada por um fármaco. Os anestésicos são agentes físicos ou químicos que, com o aumento da exposição ou concentração, primeiro acalmam (sedam), e depois causam a perda de mobilidade, equilíbrio, consciência e, finalmente, das ações reflexas, por evitarem a iniciação e condução do impulso nervoso (Summerfelt e Smith, 1990).

A administração dos anestésicos pode ser realizada de duas formas: por inalação e por via injetável, sendo a primeira a forma mais utilizada no Brasil (Roubach e Gomes, 2001). A droga entra no sistema circulatório dos peixes através das brânquias, via sistema respiratório, podendo causar a perda da capacidade natatória, ou seja, imobilização, com ou sem perda de consciência. Esta perda de consciência dos peixes implica na ausência de resposta a estímulos, o que usualmente significa, também, a perda de algumas ações reflexas específicas (Summerfelt e Smith, 1990). Estudo recente avaliou a viabilidade do eugenol como anestésico para o pirarucu por aspersão direta nas brânquias, considerando que, por ser um animal de grande porte, a realização de banhos anestésicos, muitas vezes, não é possível devido ao tamanho do animal e devido ao risco de afogamento do peixe pulmonado. Além disso, é comum o relato de acidentes envolvendo pancadas violentas em técnicos durante o manejo. O eugenol borrifado nas brânquias (30 a 60 mg/L) mostrou-se viável como anestésico para o pirarucu (Honzaryk e Inoue, 2009).

Os procedimentos anestésicos devem ser realizados da forma mais eficiente possível, tanto do ponto de vista biológico, anestesiando os peixes sem causar nenhum problema no crescimento e na reprodução, como a utilização de uma dose correta, evitando desperdícios ou a morte dos animais por elevada concentração (Roubach e Gomes, 2001).

São considerados efeitos positivos do uso de anestésico a redução da atividade, do estímulo visual, do consumo de oxigênio e da excreção de amônia (Wurts, 1995). Já como pontos negativos observa-se a perda de muco, irritação das brânquias, danos na córnea (Inoue et al., 2003), a redução da proteção do peixe contra patógenos oportunistas e aumento da resposta de estresse (Carneiro e Urbinati, 2002).

Alguns fatores biológicos e ambientais podem influenciar a anestesia nos peixes. Entre os fatores biológicos devem-se considerar as diferenças entre as espécies, como o formato do corpo e tamanho da área branquial, e as diferenças entre os peixes de uma mesma espécie, tais como tamanho, variação na taxa metabólica e quantidade de gordura corporal. Entre os fatores ambientais de maior importância na anestesia dos peixes de água doce, destacam-se a temperatura e o pH. A temperatura determina a taxa metabólica do peixe; quanto mais alta, maior a taxa metabólica e, conseqüentemente, mais rápida a indução. Já o pH da água está diretamente ligado à eficiência de certos anestésicos como quinaldina e com a reação estressante dos peixes a baixo pH quando expostos ao MS-222 e 2-fenoxietanol (Roubach e Gomes, 2001; Zuccarelli e Ingermann, 2005). Segundo Ross e Ross (1999), a anestesia pode também ser realizada por hipotermia representando um método de anestesia sem utilização de produtos químicos.

Cada anestésico vai exigir uma concentração diferente de acordo com o estágio de sedação desejado e um tempo de exposição considerado adequado. Os estágios vão desde uma sedação leve até uma sobredose (Tabela 1), devendo estes serem identificados pelo operador. O estágio normalmente utilizado para biometria, manuseio dos peixes e reprodutores é a anestesia profunda e este estágio deve ser atingido entre um e três minutos. Para avaliações da sanidade e intervenções cirúrgicas o estágio é o de anestesia cirúrgica e este deve ser alcançado entre três e cinco minutos. A recuperação dos animais deve ser rápida, e tempo inferior a cinco minutos é considerado adequado (Roubach e Gomes, 2001). Sabe-se que a resistência e a tolerância aos anestésicos variam de indivíduo para indivíduo e que mesmo espécies afins podem diferir muito a esse respeito (Hikasa et al., 1986).

No Brasil, o anestésico mais utilizado é a benzocaína (Gomes et al., 2001). A benzocaína, em mamíferos, é um anestésico de uso local, mas em peixes é usado como anestésico geral aplicado por imersão (Meinertz, 1999). Tem sido utilizada para tranquilização, analgesia e anestesia de peixes de várias espécies, tendo sido observada margem de segurança muito pequena entre a dose eficaz e a dose letal (Olfert et al., 1993). Sabe-se também que os parâmetros farmacocinéticos da benzocaína aumentam com a elevação da temperatura da água (Meinertz, 1999), mas sua eficácia não é afetada

pela dureza nem pelo pH da água (Iversen et al., 2003). Segundo Ross e Ross (1999), a exposição a este fármaco não implica em redução de crescimento e na atividade reprodutiva do peixe. A benzocaína não apresenta riscos ao manipulador (Roubach e Gomes, 2001) e atende aos critérios estabelecidos por Ross e Ross (1999) como sendo um anestésico ideal para peixes. De acordo com a literatura, a dosagem de benzocaína indicada para tilápia é 25-100 mg/L (Coyle et al., 2004), para tambaqui (*Colossoma macropomum*) 100-150 mg/L (Gomes et al., 2001), carpas 50 a 100 mg/mL, bacalhau 40 mg/L, salmão 25 a 45 mg/L e *Morone saxatilis* 55 a 80 mg/L (Olfert et al., 1993) e lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) 100 mg/L (Gimbo et al., 2008). Pampos (*Trachinotus marginatus*) foram expostos a 25, 50, 75, 100 e 150 ppm de benzocaína e 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 ppm de eugenol e concluiu-se que 50 ppm de ambos qualificam tais substâncias como bons anestésicos (Okamoto et al., 2009). Antunes et al. (2008) testaram diferentes dosagens de benzocaína (100, 140, 180 e 220 mg/L) para carpas (*Cyprinus carpio*) e todas se mostraram seguras e eficientes. O mesmo estudo afirma que partindo de uma dose mínima de 125,79 mg/mL e peso corporal de 147,45 g, um aumento no peso da carpa em 1 g, corresponde a um aumento de 0,158 mg/L de benzocaína para se obter anestesia.

O óleo de cravo é resultado da destilação das folhas, flores (incluindo talo) da árvore de cravo (*Eugenia arnotica*) sendo a substância ativa o eugenol (Keene et al., 1998). O eugenol vem sendo utilizado como anestésico de peixes em vários países, com vantagens econômicas e sem propriedades tóxicas aparentes (Soto e Burhanuddin, 1995; Inoue e Moraes, 2007).

O mecanismo exato de ação do eugenol ainda não foi completamente elucidado. Porém, estudos *in vitro* indicam interação da droga com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-aminobutírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), ambos com grande importância na transmissão da dor (Aoshima e Hamamoto, 1999; Yang et al., 2003).

Estudo realizado com juvenis de matrinxãs submetidos a 50, 62,5, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mg/L de eugenol mostrou que a droga é eficiente para a anestesia profunda, sendo a concentração de 50 mg/L suficiente para indução (Vidal et al., 2007a). Com tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) exposta a diferentes concentrações de eugenol (50, 75, 100, 150, 200 e 250 mg/L) observou-se que 75 mg/L foram suficientes para uma rápida indução (Vidal et al., 2008). Segundo Coyle et al. (2004), as doses recomendadas para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) são 10-120 mg/L e carpa comum (*Cyprinus carpio*) 40-100 mg/L. Já para juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) são recomendadas 50 mg/L (Vidal et al., 2006 e Gonçalves et al., 2008), para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) 100 mg/L (Coyle et al., 2004), para robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) 40 mg/L (Souza Junior e Alves Junior, 2006), para juvenil de lambari (*Astyanax altiparanae*) 50 mg/L (Pereira-da-Silva et al., 2009), para juvenil de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) 37,5 mg/L (Vidal et al., 2007b) e para juvenil de dourado (*Salminus brasiliensis*) 40 a 60 mg/L (Hisano, 2007). Vidal et al. (2007c) observaram que não houve influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre o tempo de indução e recuperação da anestesia, mas houve diferença entre as espécies, e o tambaqui apresentou maior tempo de indução, e de recuperação do anestésico. O eugenol é um anestésico alternativo para peixes bastante divulgado nos últimos tempos por ser um produto natural (Honczaryk e Inoue, 2009), e pelo tempo de eliminação da corrente sanguínea dos peixes, que é de cerca de

48 horas, sem a necessidade de um período de carência para consumo ou liberação de peixes previamente anestesiados no ambiente (Inoue e Moraes, 2007). Já Kildea et al. (2004) relataram que a eliminação do anestésico do tecido comestível em peixes pré-expostos ocorre em torno de 12 horas. Além de ser um anestésico seguro, de baixo custo, grande eficácia, ampla margem de segurança para o peixe e ausência de toxicidade para o operador nas doses utilizadas para peixes, o óleo de cravo apresenta curto tempo de indução e alto tempo de recuperação anestésica, ideais para procedimentos mais demorados, comparado com o MS-222, nas mesmas concentrações (Keene et al., 1998).

O 2-fenoxietanol também têm sido usados para sedação de peixes, apesar de sua baixa disponibilidade no mercado e alto custo. Sua solução é bactericida e fungicida e por estas propriedades é indicado para procedimentos cirúrgicos. A indução é rápida e a recuperação muitas vezes é abrupta. Possui uma margem de segurança adequada, pois doses até duas vezes maior que a ideal não causam mortalidade (Roubach e Gomes, 2001), variando de 100 a 600 mg/L. As concentrações de 300 a 400 mg/L são indicadas para procedimentos curtos, e concentrações mais baixas entre 100 a 200 mg/L são seguras para sedações prolongadas, como em operações de transporte (Coyle et al., 2004). O 2-fenoxietanol também pode ser usado em reprodutores, pois sua utilização não causou problemas de mortalidade dos espermatozoides (Roubach e Gomes, 2001). Seu mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas envolve a expansão da membrana das células neuronais, sendo assim considerado um anestésico geral (Burka et al., 1997). Inoue et al. (2004) avaliaram o tempo de indução em juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) submetidos a oito diferentes concentrações e observaram que o tempo diminuiu em função das concentrações do anestésico testadas no intervalo de 250 a 600 mg/L, sugerindo que o fenoxietanol é um anestésico seguro para juvenis dessa espécie mesmo em elevadas concentrações, como a de 600 mg/L.

Os critérios de escolha de um anestésico têm sido usualmente a disponibilidade e o preço (Iwama e Ackerman, 1994). O anestésico ideal não deve ser tóxico para peixes e nem para manipuladores. Outro cuidado que se deve ter na utilização dos anestésicos é o tempo de eliminação do produto quando o peixe é destinado ao consumo.

Tabela 1: Estágios de anestesia e recuperação (Ross e Ross, 1999).

Estágio	Plano	Descrição	Descrição de comportamento
I	1	Sedação Leve	Responsivo a estímulos, mas reduz movimento e ventilação diminuída.
	2	Sedação profunda	Como acima, algumas anestésias, somente são receptivas a estimulação bruta.
II	1	Anestesia leve	Perda parcial de equilíbrio. Boa anestesia.
	2	Anestesia profunda	Perda total de tônus muscular, perda total de equilíbrio e ventilação quase ausente.
III		Anestesia Cirúrgica	Como acima perda total de reação aos estímulos, mesmo maciços.
IV		Colapso medular	Ventilação cessa, parada cardíaca, morte eventual. Sobredosagem

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de três diferentes anestésicos (benzocaína, 2-fenoxietanol e eugenol) para o pintado, visando atingir o estágio de anestesia cirúrgica.

Material e Método

Para realização deste experimento foram utilizados 72 juvenis de pintado provenientes do Projeto Pacu (Campo Grande, MS) e adaptados às condições experimentais por aproximadamente trinta dias, no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal. Os animais foram alimentados com ração comercial (40% de proteína bruta) uma vez ao dia entre as 18:30 e 19 horas e foram considerados adaptados quando começaram a se alimentar regularmente.

O experimento foi dividido em três partes, onde foram testados três anestésicos, benzocaina, 2-fenoxietanol e eugenol, sendo cada um deles testado em três diferentes concentrações.

Foram utilizados 24 juvenis de pintado para cada anestésico, distribuídos aleatoriamente em 12 caixas pretas de 40 L (dois animais por caixa), com sombrite e providas de renovação de água e aeração.

Na primeira parte experimental, os animais apresentavam peso e comprimento médios de $42,33 \pm 16,14$ g e $20,80 \pm 2,11$ cm, a temperatura média da água foi de $28,2 \pm 0,3$ °C e oxigênio dissolvido $6,72 \pm 0,35$ mg/mL, e os peixes foram expostos a três diferentes concentrações de benzocaina 25, 50 e 75 mg/L. Na segunda parte experimental, os animais tinham peso e comprimento médios de $40,76 \pm 9,92$ g e $20,79 \pm 1,63$ cm, a temperatura média da água das caixas permaneceu em $28,8 \pm 0,5$ °C e a concentração de oxigênio dissolvido $6,59 \pm 0,23$ mg/mL e os peixes foram expostos a três diferentes concentrações de 2-fenoxietanol 0,2; 0,4; 0,8 mL/L. Na terceira parte experimental, os animais apresentavam peso e comprimento médios de $42,6 \pm 18,3$ g e $20,9 \pm 2,12$ cm, a temperatura média foi de $28,6 \pm 0,6$ °C e oxigênio dissolvido $6,58 \pm 0,17$ mg/mL, e os peixes foram expostos a três diferentes concentrações de eugenol (0,2; 0,4 e 0,8 mL/L). Foram amostrados peixes de quatro caixas (dois animais por caixa) para cada dose (n=8). Depois de anestesiados, foi realizada uma biometria e a coleta de material biológico, retornando os peixes às caixas de recuperação (de mesmo tamanho e condições das caixas de estoque) onde permaneceram até total recuperação. Durante o experimento foram aferidos os tempos de indução necessária para que o animal alcançasse o estado de anestesia cirúrgica (Ross e Ross, 1999) e o período necessário para retornar ao estado normal.

Amostragem e métodos de análise

Os animais amostrados tiveram o sangue coletado por punção do vaso caudal. Uma parte foi colocada em microtubos contendo 15 µL de EDTA e fluoreto de potássio, sendo uma alíquota usada para a análise de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), contagem de células vermelhas (RCB) (Celm CC 550). O restante foi centrifugado (a 3000 rpm por 10 min a 4°C) para separação de plasma e análise de glicose (Kit Labtest). Parte do sangue foi colocada em outro microtubo, onde permaneceu em repouso por 2 horas, a temperatura ambiente, para separação de soro. O sangue foi centrifugado (a 3000 rpm por 10 min a 4°C) e o soro extraído e congelado para posterior análise de cortisol (Radioimunoensaio – kit DPC).

Após coleta do material biológico, os animais foram pesados e medidos, antes de retornarem as caixas de recuperação para aferir o tempo e recuperação.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, com nível de 5% de significância.

Resultados

Os níveis de cortisol sérico no teste da benzocaína não diferiram estatisticamente ($P>0,5$), embora a concentração de 50 mg/L (68,7 ng/mL) tenha induzido aumento das concentrações de cortisol sérico em relação as concentrações de 25 e 75 mg/L (55,8 e 52,1 ng/mL) (Figura 1). No teste do 2-fenoxietanol, os níveis séricos do hormônio não diferiram estatisticamente, mas tenha ocorrido uma redução das concentrações conforme aumentaram as concentrações testadas (62,3; 38,8 e 24,9 ng/mL nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L, respectivamente) (Figura 1). No teste do eugenol, os níveis de cortisol reduziram gradualmente à medida que as concentrações do eugenol aumentaram (41,1; 21,0 e 14,9 ng/mL nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L, respectivamente) (Figura 1). A diferença foi significativa no tratamento 0,2 mL/L de eugenol.

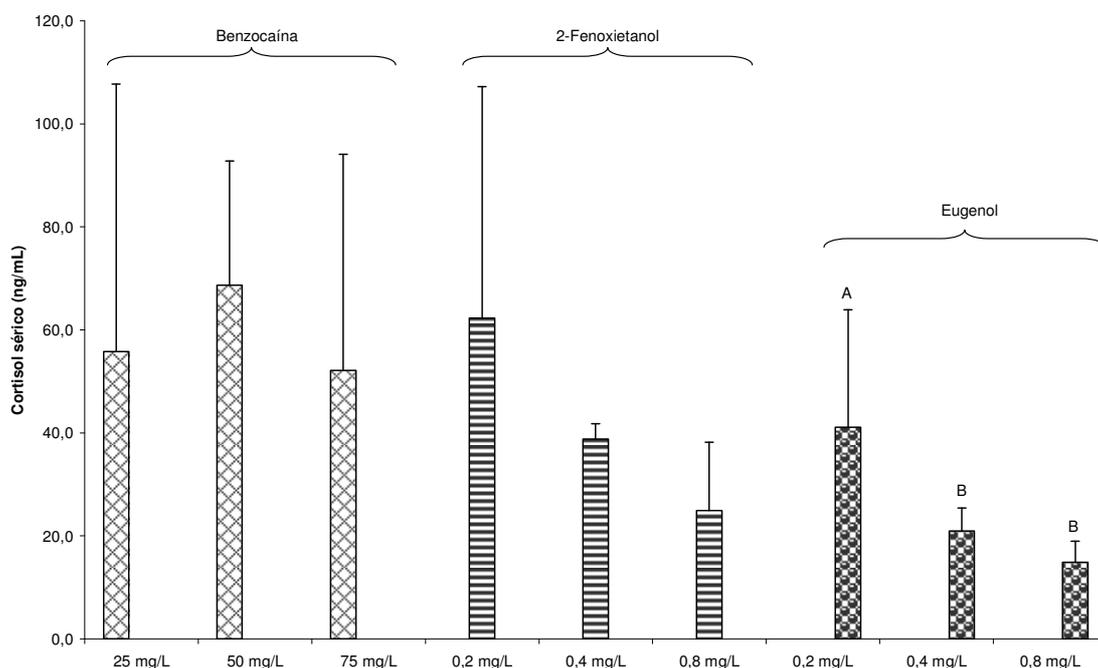


Figura 1: Cortisol sérico (ng/mL) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25; 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP ($n=8$). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %).

Os níveis de glicose plasmática não diferiram estatisticamente entre as concentrações de benzocaína testadas (95,1; 76,5 e 77,3 mg/dL nas concentrações de 25, 50 e 75 mL/L, respectivamente) (Figura 2). No teste do 2-fenoxietanol, a glicose plasmática apresentou aumento significativo nas dosagens de 0,2 e 0,4 mL/L (92,4 e 85,6 mg/dL) em relação a de 0,8 mL/L (64,3 mg/dL) (Figura 2). No teste do eugenol, o perfil de resposta de glicose plasmática nos peixes anestesiados apresentou o mesmo perfil dos tratados com fenoxietanol. Glicemias mais elevadas foram observadas nas menores concentrações do anestésico (0,2 e 0,4 mL/L) (79,7 e 77,11 mg/dL) diferentes estatisticamente de 0,8 mL/L (56,5 mg/dL) (Figura 2).

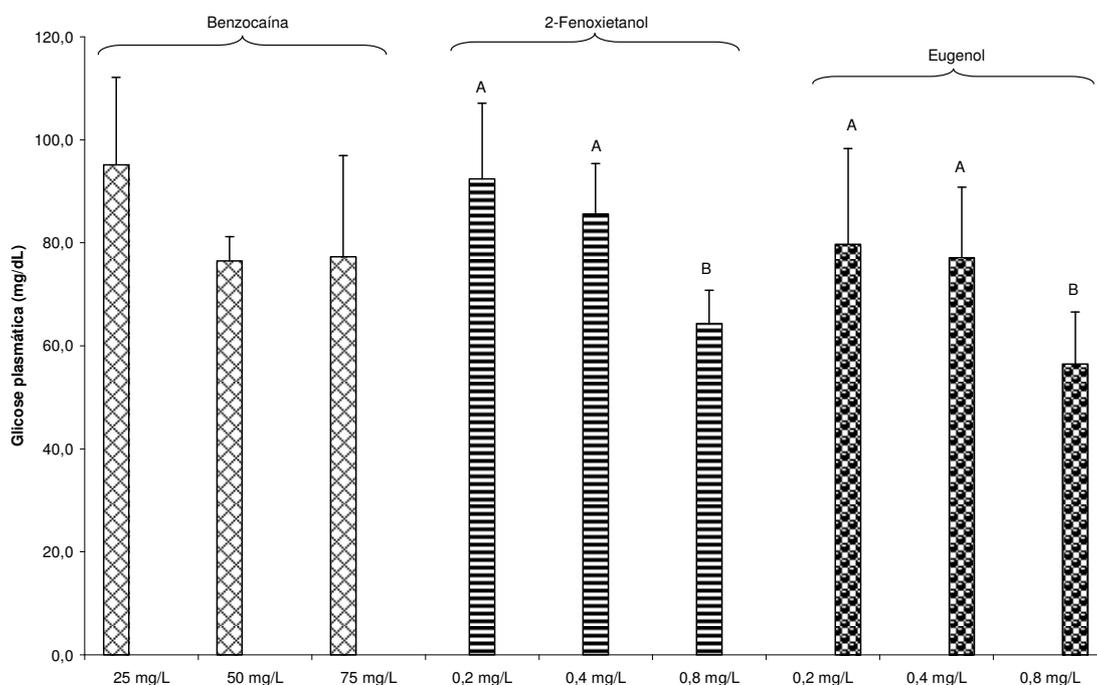


Figura 2: Glicose plasmática (mg/dL) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %).

Dentre os parâmetros hematológicos, no teste da benzocaína, o hematócrito apresentou os maiores valores nas concentrações de 25 e 50 mg/L (17,2 e 16,6 %) diferentes estatisticamente da concentração de 75 mg/L (14,5 %) (Figura 3). No teste do 2-fenoxietanol, o hematócrito não foi estatisticamente diferente nos peixes expostos às dosagens de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L (17,6; 16,4 e 16,7 %, respectivamente) (Figura 3). No teste do eugenol, foi possível observar redução do hematócrito com relação ao aumento das concentrações do anestésico, sendo os maiores valores observados na dose de 0,2 mL/L (18,4 %) diferentes estatisticamente das doses de 0,4 e 0,8 mL/L (16,6 e 15,4 %) (Figura 3).

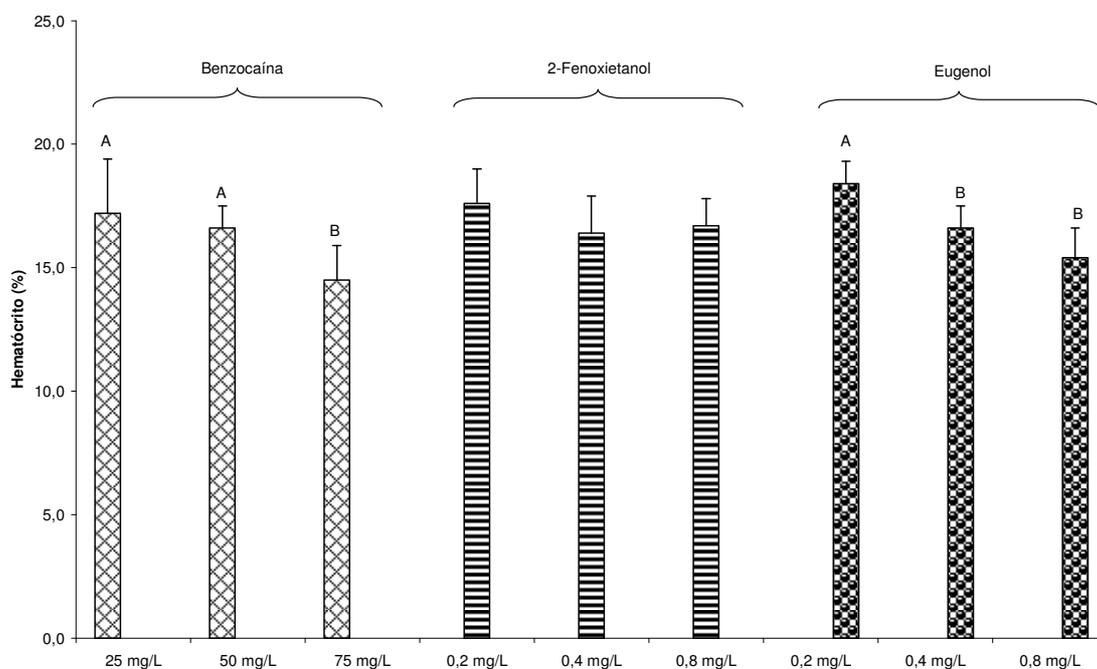


Figura 3: Hematócrito (%) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %).

O número de células vermelhas (RCB) apresentou aumento significativo na dose de 25 mg/L ($2,14 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) em relação a 75 mg/L ($1,85 \cdot 10^6/\text{mm}^3$), mas ambas não foram diferentes da dose de 50 mg/L ($2,06 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) (Figura 4). O 2-fenoxietanol, não houve diferença estatística quando comparadas as diferentes concentrações testadas (0,2; 0,4 e 0,8 mL/L - 2,28; 2,19 e $2,14 \cdot 10^6/\text{mm}^3$, respectivamente) (Figura 4). No eugenol o número células vermelhas teve o mesmo perfil da benzocaína, diminuindo conforme aumentava a concentração de eugenol. O maior valor foi na dose de 0,2 mL/L ($2,25 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) que foi diferente estatisticamente das doses de 0,4 e 0,8 mL/L ($2,03$ e $1,99 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) (Figura 4).

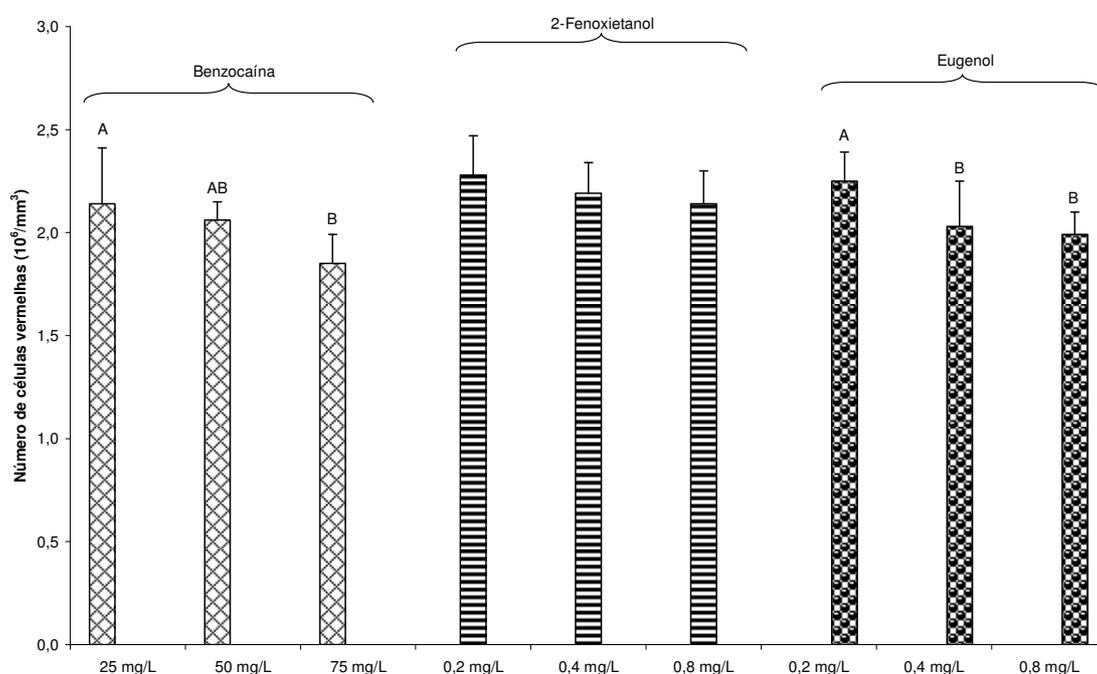


Figura 4: Número de células vermelhas ($10^6/\text{mm}^3$) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %).

Os valores de volume corpuscular médio (VCM) dos peixes não diferiram significativamente entre si, embora tenham apresentado uma diminuição progressiva com o aumento da concentração de benzocaína 25, 50 e 75 mg/L (80,7; 79,9 e 79,2 μ^3 , respectivamente) (Figura 5). No teste do 2-fenoxietanol, houve diferença significativa entre as concentrações testadas, sendo que os maiores valores foram encontrados na concentração de 0,4 mL/L (81,8 μ^3) seguidos pela concentração de 0,8 mL/L (78,2 μ^3) e 0,2 mL/L (74,9 μ^3) (Figura 5). No teste do eugenol o VCM dos peixes não diferiu significativamente, embora tenha apresentado maior valor na concentração de 0,2 mL/L de eugenol (81,6 μ^3) em relação a 0,4 e 0,8 mL/L (78,6 e 78,4 μ^3) (Figura 5).

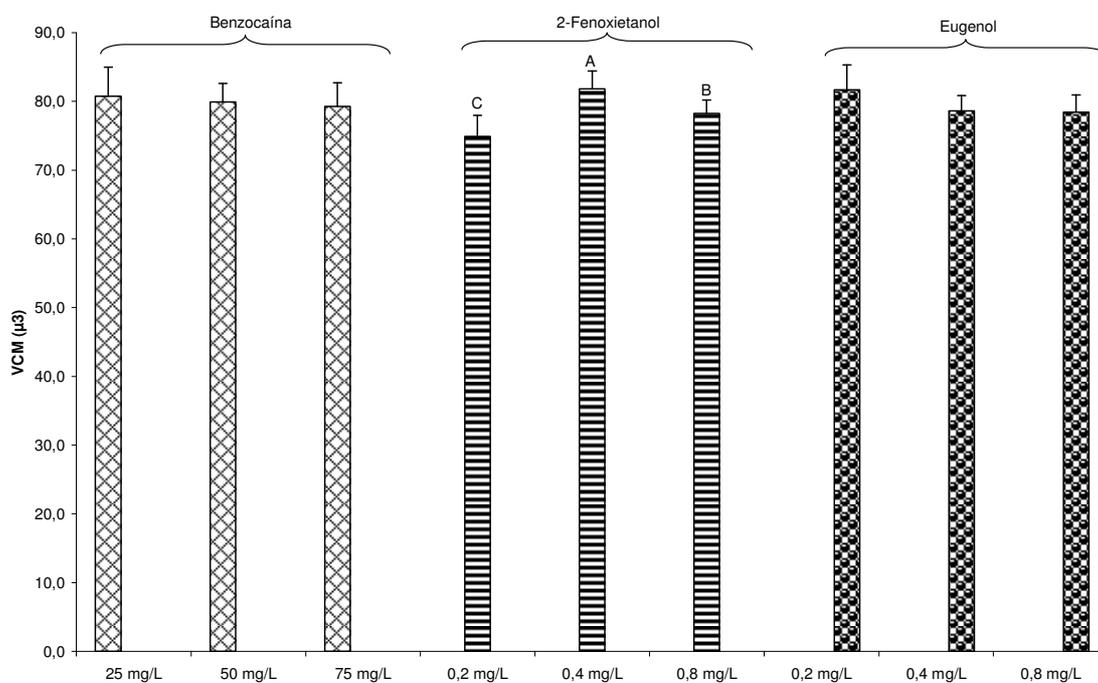


Figura 5: Volume corpuscular médio (μ^3) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %).

A concentração de hemoglobina aumentou na concentração de 25 mg/L de benzocaína (5,98 g/dL) em relação às concentrações de 50 e 75 mg/L (5,42 e 5,35 g/dL) (Figura 6). No teste do fenoxietanol não houve diferença estatística entre as concentrações testadas de 2-fenoxietanol (6,47; 6,18 e 6,05 g/dL nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L, respectivamente) (Figura 6). Os maiores valores foram registrados na concentração de 0,2 mL/L de eugenol (6,38 g/dL) em relação a 0,8 mL/L (5,77 g/dL), e os valores de ambas as concentrações não foram diferentes estatisticamente dos valores da concentração de 0,4 mL/L (5,93 g/dL) (Figura 6).

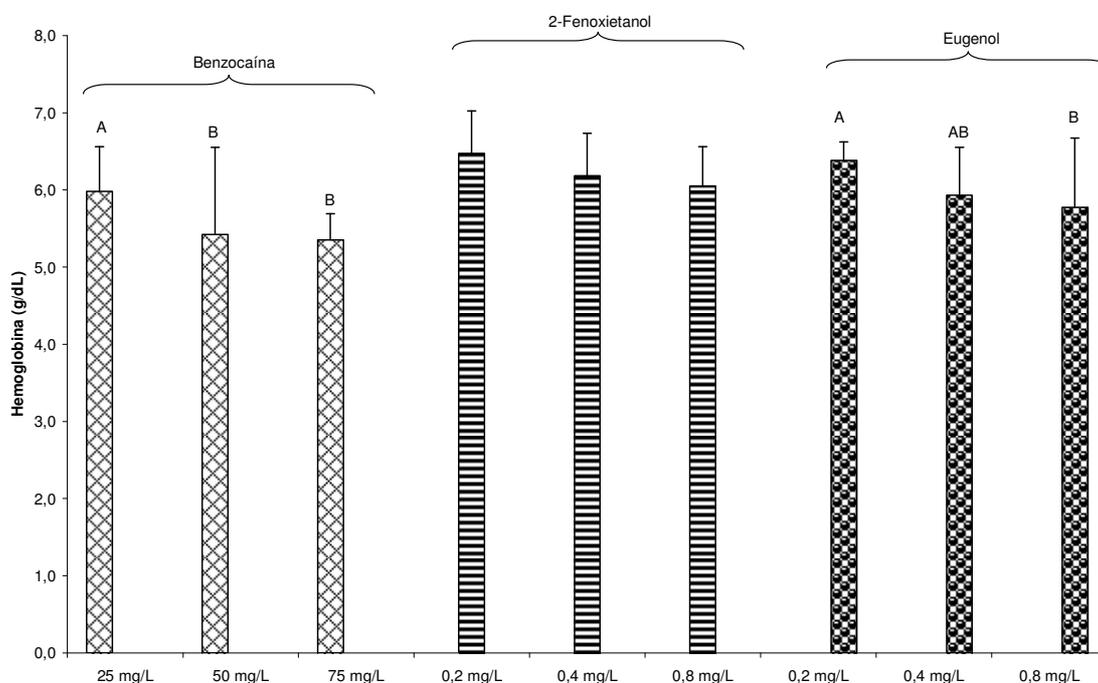


Figura 6: Hemoglobina (g/dL) de pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L, 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L e eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L. Valores são médias \pm DP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5 %).

Os peixes expostos a concentração de 25 mg/L de benzocaína apresentaram maior tempo de indução anestésica (11,1 min.) em relação às concentrações de 50 e 75 mg/L (3,4 e 2,7 min.). Já os tempos de recuperação não foram diferentes

estatisticamente entre as diferentes concentrações (3,8; 4,0 e 3,9 nas concentrações de 25; 50 e 75 mg/L, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2: Tempos de indução e recuperação do pintados anestesiados com benzocaína nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L.

Benzocaína	Tempos de indução (min.)	Tempos de recuperação (min.)
25mg/L	11,1 ± 3,33 A	3,8 ± 0,73A
50mg/L	3,4 ± 0,82 B	4,0 ± 0,76A
75mg/L	2,7 ± 0,54 B	3,9 ± 1,03A

Valores são médias ± DP (n=8). Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5%).

Os tempos de indução foram significativamente maiores na concentração de 0,2 mL/L de 2-fenoxietanol (10,3 min.) em relação à 0,4 e 0,8 mL/L (3,2 e 1,2 min.), mas não houve diferença estatística nos tempos de recuperação entre as três concentrações (2,7; 2,4 e 2,7 min. nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3: Tempos de indução e recuperação do pintados anestesiados com 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L.

2-fenoxietanol	Tempos de indução (min)	Tempos de recuperação (min.)
0,2 mL/L	10,3 ± 3,56 A	2,7 ± 0,95A
0,4 mL/L	3,2 ± 1,06 B	2,4 ± 0,87A
0,8 mL/L	1,2 ± 0,41 B	2,7 ± 0,87A

Valores são médias ± DP (n=8). Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5%).

O maior tempo de indução anestésica foi observado nos peixes expostos à concentração de 0,2 mL/L de eugenol (2,4 min.) diferenciando-se estatisticamente das demais 0,4 e 0,8 mL/L (1,1 e 0,8 min., respectivamente). Já o tempo de recuperação apresentou um aumento significativo com o aumento das concentrações do anestésico (2,8; 3,8 e 4,8 nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4: Tempos de indução e recuperação do pintados anestesiados com eugenol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mL/L.

Eugenol	Tempos de indução (min.)	Tempos de recuperação (min.)
0,2 mL/L	2,4 ± 0,39 A	2,8 ± 0,55 C
0,4 mL/L	1,1 ± 0,28 B	3,8 ± 0,77 B
0,8 mL/L	0,8 ± 0,18 B	4,8 ± 0,89 A

Valores são médias ± DP (n=8). Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (5%).

Após o experimento os animais expostos aos três anestésicos testados foram monitorados durante uma semana e não houve mortalidade e nem presença de doenças.

Discussão

Nos três anestésicos testados (benzocaína, 2-fenoxietanol e eugenol) foi alcançado o estágio anestésico proposto, que corresponde ao estágio relativo a procedimento de anestesia cirúrgica. Este estágio deve ser alcançado entre três e cinco minutos e a recuperação deve ser rápida, inferior a cinco minutos (Roubach e Gomes, 2001). Entre os anestésicos e as dosagens testadas a benzocaína na concentração de 25 mg/L e 2-fenoxietanol na concentração de 0,2 mL/L é que não ficaram dentro dos tempos de indução indicados. Os tempos de indução nos três experimentos apresentaram o mesmo perfil, onde os maiores tempos foram nas menores doses. Resultados similares foram encontrados por Weber et al. (2009) ao comparar 2-fenoxietanol, MS-222, óleo de cravo e metomidate.

Os tempos de recuperação foram semelhantes para benzocaína e 2-fenoxietanol, podendo ser justificado tempos de indução mais rápidos relacionados a doses mais altas pelo fato do animal permanecer menos tempo em contato com o anestésico (Mylonas et al., 2005). Os resultados obtidos para tempos de recuperação com a utilização do eugenol aumentaram conforme aumentaram as concentrações. Resultados semelhantes foram relatados por Vidal et al. (2006).

Na benzocaína, os melhores tempos de indução e recuperação foram observados nas dosagens de 50 e 75 mg/L, embora a concentração de 50 mg/L tenha apresentado os maiores níveis séricos de cortisol. Para pampo (*T. marginatus*) o melhor tempo de indução e recuperação foi na concentração de 50 ppm de benzocaína (Okamoto et al., 2009). Resultados satisfatórios para anestesia profunda em matrinxã foram alcançados com concentração de 60 mg/L (Inoue et al., 2004). Antunes et al. (2008), testaram a melhor dose de cloridrato de benzocaína relacionando ao peso, e concluiu que partindo de uma dose mínima de 125,79 mg/mL e peso de 147,45 g, um aumento de peso da carpa (*Cyprinus carpio*) de 1 g, corresponde a um aumento de 0,158 mg/L na dose de cloridrato de benzocaína. 'Office Animal Resources Anesthetic' (2005) e 'Drug Dosages for Fish' (2005) indicam as doses de 25-50 mg/L de benzocaína para anestesiarem peixes. Segundo Balasina (2006), a benzocaína provoca uma resposta aguda ao estresse, com elevação nos níveis de cortisol, mas que é revertida rapidamente.

No teste do 2-fenoxietanol os melhores tempos de indução foi observado na dosagem de 0,8 mL/L, onde também apresentou as menores concentrações de cortisol sérico. Woynarowich e Horvat (1980) relataram 0,3 mL/L de 2-fenoxietanol é uma

concentração segura para a anestesia de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). Para linguado senegalês (*Solea senegalemsis*), a dose eficaz foi 600 mg/L (Weber et al., 2009). O uso repetido de 2-fenoxietanol aumenta a tolerância dos peixes à anestesia (Weyl et al., 1996).

No teste do eugenol, os tempos de indução mais rápidos foram observados na dosagem de 0,8 mL/L, mas o de recuperação foi menor na de 0,2 mL/L. Os níveis de cortisol sérico foram maiores na menor dosagem (0,2 mL/L) e menores na mais alta (0,8 mL/L), embora esta não tenha sido diferente estatisticamente da dosagem intermediária (0,4 mL/L). Para matrinxã, lambari e pintado a dose de 50 mg/L já foi suficiente para indução (Vidal et al., 2007a; Pereira-da-Silva, et al., 2009 e Vidal et al., 2006). Trabalhos realizados por Waterstrat (1999) e Vidal et al. (2006) observaram que a dose de 25 mg/L de eugenol não foi suficiente para anestesia profunda em alevinos de bagre do canal e pintado. Em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) a concentração de 37,5 mg/L é capaz de induzir a anestesia. Exemplos de *Epinephelus bruneus* submetidos à anestesia com óleo de cravo na concentração de 150 mg/L e temperatura de 22 °C demoraram 3 dias para que os níveis de cortisol e glicose plasmática retornassem aos níveis observados antes da exposição (Park et al., 2008). Segundo Iversen et al. (2003), o eugenol não impediu a elevação do cortisol em salmão do Atlântico (*Salmo solar L.*).

Os níveis de glicose plasmática podem ser alterados em situação de estresse para gerar energia numa reação conhecida como “luta e fuga” (Wedemeyer et al., 1990), quando os animais tentam se adaptar à condição estressora, sendo atribuído primeiro a ação das catecolaminas (Mazeaud e Mazeaud, 1981; Wendelaar Bonga, 1997), que atuam diretamente no fígado e músculo esquelético provocando a quebra do glicogênio que, secundariamente, é mantida por ação do cortisol, por efeito gliconeogênico (Mommsen et al., 1999). A benzocaína induziu oscilações na glicose plasmática entre as dosagens, mas não foram significativas. Já com o fenoxietanol, a glicemia foi mais alta nas concentrações de 0,2 e 0,4 mL/L quando comparadas a dosagem de 0,8mL/L. O mesmo perfil foi encontrado para o eugenol, onde os maiores valores foram nas concentrações de 0,2 e 0,4 mL/L quando comparado a concentração de 0,8mL/L.

Os parâmetros sanguíneos de peixes teleósteos podem ser afetados por estresse agudo ou crônico, como revisto por Barton e Iwama (1991) e Wendelaar Bonga (1997). Os parâmetros hematológicos são utilizados como indicadores de estresse em peixes (Fabbri et al., 1998). Nos três anestésicos testados, o hematócrito apresentou os maiores

valores nas menores dosagens. Este perfil foi acompanhado pelo número de células vermelhas e concentração de hemoglobina, sugerindo uma hemodiluição, causada pela perda eletrolítica e redução da osmolaridade. Segundo Morgan e Iwama (1997), as mudanças no hematócrito durante respostas de estresse indicam hemoconcentração ou hemodiluição devido aos distúrbios osmorregulatórios.

Conclusão

Todos os anestésico avaliados foram eficientes para anestesia cirúrgica em juvenis de pintado, sendo a concentração de 75 mg/mL de benzocaína, 0,8 mL/L de fenoxietanol e eugenol as que apresentaram bons tempos de indução e recuperação acompanhado dos menores níveis séricos de cortisol e glicose plasmática.

Bibliografia

ANTUNES M.I.P.P.; SPURIO, R.S.; GODOI, D.A.; GRUMADAS, C.E.S.; ROCHA, M.A. Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*). **Semia: Ciências Agrárias**. v.29, n.1, p.151-156, 2008.

AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, p.743-748, 1999.

BALASINA, S.N.; Cortisol and hematological response in brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. **Aquaculture International**, v. 14, p. 569-575, 2006.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Diseases**, v.10, p.3-26, 1991.

BOURNE, P.K. The use of MS-222 (tricaine methanesulphonate) as an anaesthetic for routine blood sampling in three species of marine teleosts. **Aquaculture**, v. 36, p. 313-321, 1984.

BURKA, J.F.; HAMMELL, K.L.; HORSBERG, T.E.; JOHNSON, G.R.; RAINNIE, D.J.; SPEARE, D.J. Drugs in salmonid aquaculture. - A review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic**, v.20, p.333-349, 1997.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Plasma electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. **Journal of Applied Aquaculture**, v.11, n.4, p.1-13, 2001b.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Transport with different benzocaine concentrations and consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus*. **Acta Scientiarum**, v.24, n.2, p.555-560, 2002.

COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. Anesthetics in aquaculture. **Southern Regional Aquaculture Center**, Publication n° 3900, 2004.

DRUG DOSAGES FOR FISH. Office of animal research services. Disponível em <http://www.oars.uconn.edu>. Acesso 6 dez. 2005.

FABBRI, E.; CAPUZZO, A.; MOON, T.W. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120 C, p.177-192, 1989.

GIMBO, R.Y.; SAITA, M.V.; GONÇALVES, A.F.N.; TAKAHASHI, L.S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução do lambari-do-rabo-amarelo (*Astynax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p.350-357, 2008.

GOMES, L.C.; GOMES-CHIPPARI, R.A.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; LIMA-ARAÚJO, C.A.R.M. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.32, n.4, p.426-431, 2001.

GONÇALVES, A.F.N.; SANTOS, E.C.C.; FERNANDES, JBK.; TAKARAHI, L.S. Metanol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.30, n.3, p. 339-344, 2008.

GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1453-1464, 2000.

HIKASA, Y.; TAKASE, K.; OGASAWARA, T.; OGASAWARA, S. Anesthesia and with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp *Cyprinus carpio*. **Nippon Juigaku Zasshi**, v.48, n.2, p.341-351, 1986.

HISANO, H.; ISHIKAWA, M.M.; FERREIRA, R.A.; BULGARELLI, A.L.A.; COSTA, T.R.; PÁDUA, S.B. **Óleo de cravo como anestésico para juvenis de**

dourado. 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce. 1º Encontro de piscicultores de Mato Grosso do Sul. Dourados – MS. 2007.

HONCZARYK, A.; INOUE, L.A.K.A. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.577-579, 2009.

HOVDA, J.; LINLEY, T.J. The potential application of hypothermia for anesthesia in adult pacific salmon. **North American Journal of Aquaculture**, v.62, p.67-72, 2000.

INOUE, L.A.K.A.; NETO, C.S.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.943-94, 2003.

INOUE, L.A.K.A.; NETO, C.S.; MORAES, G. Standardization of 2-phenoxyetanol as anesthetic for juvenile *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): The use in field procedures. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.563-565, 2004.

INOUE, L.A.K.A.; MORAES, G. Óleo de cravo: Um anestésico alternativo para manejo de peixes. **Embrapa Amazônia Ocidental**, Manaus, AM, p.22, 2007.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R.S.; ELIASSEN, R.A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-STM and Benzoak as anesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress reducing capacity. **Aquaculture**, v.221, p.549–566, 2003.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R.A.; FINSTAD, B. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. **Aquaculture Research**, v.40, p.233-241, 2009.

IWAMA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN, T. (Eds.) **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier Science, Amsterdam, v.3 p.1-15, 1994.

KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO, C.G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89-101, 1998.

KILDEA, M.A.; ALLAN, G.L.; KEARNEY, R.E. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and Aquis-S from the tissue of perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v.232, p.265-277, 2004.

MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed), **Stress and fish**. Academic Press, p. 49-76, 1981.

MEINERTZ, I.R. Metabolism, elimination, and pharmacokinetics of the anesthetic benzocaine. In: SMITH, D.J.; GINGERICH, W.H.; BECONI-BARKER, M.G. Xenobiotics in fish. **Dordrecht: Klumer Academic Publishers**, p.189-200, 1999.

MGBENKA, B.O.; EJIOFOR, E.N. Effects of extracts of dried leaves of *Erythrophleum suaveolens* as anesthetics on clariid catfish. **Journal of Applied Aquaculture**, v.8, p.73-80, 1998.

MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-fenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN. M.M., T.W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.

OKAMOTO, M.H.; TESSER, M.B.; LOUZADA, L.R.; SANTOS, R.A. dos; SAMPAIO, L.A. Benzocaina e eugenol como anestésico para juvenis do panpo *Trachinotus maeginatus*. *Ciência Rural*, v. 39, n. 3, p. 866-870, 2009.

OFFICE ANIMALE RESOURCES ANAESTHETICS: Anesthesia for various animals. Disponível em: www.vetmed.auburn.edu. Acesso em: 6 dez, 2006.

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; MCWILLIAM, A.A. Anesthetic and sedative drug dosage – fishes. In: **Guide to the care and use of experimental animals**. 2nd ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 1993. p.192.

PARK, M.O.; HUR, W.J.; IM, S.Y.; SEOL, D.W.; LEE, J.; PARK, I.S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2008.

PEREIRA-DA-SILVA, E.; OLIVEIRA, R.H.F.; RIBEIRO, M.A.R.; COPPALA, M.P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, ISSN0103-8478, 2009.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**, 2nd ed. Blackwell, London, UK. 159 p., 1999.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, v.11, n.66, p.37-40, 2001.

SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p.177-185, 2003.

SMIT, G.L.; HATTINGH, J.; BURGER, A.P. Haematological assessment of the effects of the anaesthetic MS222 in natural and neutralized form in three freshwater fish species: interspecies differences. **Journal fish biological**, v. 15, p. 633-643, 1979.

SOTO, C.; BURHANUDDIN, C. Clove oil as a fish anesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v.136, p.149-152, 1995.

SOUZA JUNIOR, V.B.; ALVES JUNIOR, T.T. A eficácia do óleo de cravo (eugenol) como anestésico no manejo de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*, mantido em cativeiro. In: AQUACIENCIA 2006. Bento Gonçalves. **Anais...Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, 2006. CD-Room.

SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.S. Anaesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. (Eds.), **Methods for Fish Biology**. **American Fisheries Society**, p.213-272, 1990.

THOMAS, P.; ROBERTSON, L. Plasma cortisol and glucose stress response of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anaesthesia with MS222, quinaldine sulfate and metomidate. **Aquaculture**, v. 96, p. 69-86, 1991.

TORT, L.; PUICERVER, M.; CRESPO, S. PADRÓS, F. Cortisol and haematological response in sea bream and trout submitted to the anaesthetics clove oil and 2-fenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleost: Characidae), to transport stress under influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.16, n.1, p.75-85, 2001.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; SANTOS NETO, E.B.; DEUS, B.T.; ALBINATI, A.C.L. Influência do peso de juvenis de matrinxãs (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) na ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.3, p.212-216, 2007c.

VIDAL, L.V.O.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S.; SCHAMBER, C.R.; SANTOS, L.D.; SOARES, C.M. Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macropthalmus*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.29, n.4, p.657-362, 2007b.

VIDAL, L.V.O.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S.; SCHAMBER, C.R.; SILVA, L.C.R.; SANTOS, L.D.; SOUZA, S.R. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxãs (*Brycon cephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p.335-342, 2007a.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; MECÊDO, G.R. Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscan*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.28, n.3, p.275-279, 2006.

WATERSTRAT, P.R. Induction and recovery from anaesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, p. 250-255, 1999.

WEBER, R.A.; PELETEIRO, J.B.; GARCÍA MARTÍN, L.O.; ALDEGUNDE, C.M. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v. 288, p. 147-150, 2009.

WEDEMEYER, G.; BARTON, B.A.; McLEAY, D.J. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. (Eds.). *Methods for Fish Biology*. **American Fisheries Society**, p.451-489, 1990.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WEYL, O.; KAISER, H.; HECHT, T. On efficacy and mode of 2-fenoxyrthanol as an anaesthetic for golg fish, *Carasius auratus* (L.), at different temperatures and concentrations. **Aquaculture Research**, v. 27, p. 757-764, 1996.

WOYNAROWICH, T.; HORVAT, T. The artificial propagation of warm-water finfishes. **FAO Fisch Tech Paper**, v. 201, p. 138-147, 1980.

WURTS, W.A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v. 26, n. 3, p. 80-81, 1995.

YANG, B.H.; PIAO, Z.G.; KIM, Y.B.; LEE, C.H.; LEE, J.K.; PARK, K.; KIM, J.S.; OH, S.B. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003.

ZUCCARELLI, M.D.; INGERMANN, R.L. Influence of neutralizing agents on the anaesthetic efficacy of tricaine on *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry. **Aquaculture Research**, v.36, p.933-935, 2005.