

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Indicadores de insensibilização em
tilápia-do-Nilo**

Clarissa Lerois Carlos

Jaboticabal, São Paulo

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Indicadores de insensibilização em tilápia- do-Nilo

Clarissa Lerois Carlos

Orientadora: Dra. Percília Cardoso Giaquinto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo
2015

Sumário

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
1. Introdução	5
2. Materiais e métodos	8
2.1 - Animais e condições de estoque	8
2.2 - Delineamento experimental	8
2.2.1 –Procedimentos específicos	10
2.2.2 – Controle e benzocaína.....	11
2.2.3 – Termonarcore	11
2.2.4 – Narcose por dióxido de carbono	12
2.2.5 – Ética.....	13
2.3 Análises estatísticas	13
3. Resultados	13
4. Discussão	18
5. Referências bibliográficas	20

Agradecimentos

São muitas pessoas as quais devo agradecer pelo apoio que me manteve firme durante os dois anos de mestrado, e então tentarei ser breve começando pelos meus pais Vera e Neto, que sempre apostaram em mim, me deram toda a força que precisei e incentivo para correr atrás do que eu realmente quero alcançar na vida. A minha mãe biológica Cleide que não está fisicamente comigo, mas tenho certeza que vibra e abençoa cada passo meu. Meus irmãos Bruno e Gabriela, pelo companheirismo e torcida. Eu amo vocês incondicionalmente!

A minha orientadora Percília, por ter topado o desafio de me orientar numa área nova e por ter desenvolvido em mim interesse e empolgação pela Biologia, que é realmente uma área fantástica. De me deixar livre para fazer minhas escolhas durante o mestrado e assim deixo Botucatu, com enorme aprendizado para o resto da vida, pois agora vejo como cheguei crua e sairei completa em muitos aspectos.

Ao Professor Hoshino, exemplo de dedicação e amor pela ciência. Sempre disposto a “quebrar a cabeça” comigo para resolver questões do projeto a qualquer momento. Aproveito também para agradecer aos Professores Gilson, Helton e Rodrigo pelas dicas e ajuda que levarei comigo.

Felipe, que me acompanhou nessa jornada e sempre me incentivou e deu forças para seguir em frente. Comemorou comigo nas pequenas e grandes vitórias.

Ao Professor Raoul e ao técnico Amílton, que me acolheram de braços abertos no Departamento de Zoologia. Tiveram paciência e entusiasmo em me ensinar.

Aos colegas de laboratório Vanessa, Juliane, Adriana e Rafaela pela companhia, risadas, ajuda, pelo ambiente bom de conviver que construímos juntos e ao Bruno que, além de tudo isso foi essencial para meu desenvolvimento científico.

Ao CEATOX, onde fiz parte do experimento e tive a oportunidade de perceber como a Universidade abre portas e abriga pessoas tão generosas.

As companheiras de república, Patrícia, Ivi, Aninha e Victória, essenciais muitas vezes para me manter equilibrada e aprender que a convivência pode ser harmoniosa e divertida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPQ, pelo suporte financeiro durante o mestrado, que possibilitou a realização de todo o projeto.

Meu último e importantíssimo agradecimento vai para os peixes que usei em meu experimento, sem eles eu jamais teria chegado aqui. Todo o meu respeito a esses seres que eu aprendi a gostar tanto.

Resumo

A redução do sofrimento no momento do abate de animais de produção é preocupação atual e, dada a alta produção de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), o monitoramento do grau de insensibilização pré-abate em peixes necessita mais estudos quando comparado a outras espécies. Sendo o abate a etapa mais crítica da criação animal, a aplicação de boas práticas de manejo que atendam o bem-estar animal torna-se essencial para obter êxito nesta fase. Diante da relevância de explorar métodos que desvendem o nível de insensibilização de peixes no momento da insensibilização, o presente estudo teve como objetivo testar se o reflexo de eriçamento da nadadeira dorsal (REN) produzido pelo estímulo manual pode ser candidato a indicador da perda de sensibilidade. Para tanto, exploramos, inicialmente, os efeitos da benzocaína sobre o reflexo, anestésico amplamente empregado para peixes. Foi observada a latência, duração e velocidade de recuperação do REN. Em seguida, aplicamos métodos de insensibilização comumente utilizados na piscicultura. São eles: termonarrose e narrose por dióxido de carbono, com a finalidade de testar se o REN desaparece como o observado com a benzocaína. Além disso, testamos o reflexo de rotação ocular (RO) com o objetivo de comparação entre os métodos REN e RO e a capacidade de corrigir a postura durante a indução anestésica. Todos os peixes perderam os reflexos analisados em dado momento dos experimentos, logo, nossos resultados mostram que o REN pode ser indicador de insensibilidade em tilápia-do-Nilo. Apesar de a RO ter perda mais rápida e recuperação mais lenta do que REN, houve pouca diferença de tempo. No entanto, por RO e REN serem reflexos, são importantes para indicar insensibilização, sendo possível unir os dois métodos como estratégia para aferir inconsciência em tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: nadadeira dorsal, rotação ocular, insensibilização, bem-estar animal, reflexo.

Abstract

The reduction of suffering at the time of production of animal slaughter is current concern, given the high production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), monitoring the degree of pre-slaughter in fish stunning needs more study when compared to other species. And slaughter the most critical stage of breeding, the application of good management practices that meet the animal welfare becomes essential for success at this stage. Given the importance of exploring methods to unveil the fish level of consciousness at the time of stunning, this study aimed to test whether the bristling reflection of the dorsal fin (REN) produced by manual stimulation may be a candidate for sensitivity loss indicator. To this end, we explore, initially, the effects of benzocaine on reflection, anesthetic widely used for fish. Latency, duration and REN recovery rate was observed. We then apply stunning methods commonly used in fish farming, they are: termonarcese narcosis and carbon dioxide, in order to test whether the REN disappears as observed with benzocaine. In addition, we tested the reflection of eye rotation (RO) for the purpose of comparison between the REN and RO methods and the ability to correct posture during induction. All fish lost reflections analyzed at one point of the experiments, so our results show that the REN insensitivity can be indicator in the Nile tilapia. However, although the RO have more rapid loss and slower recovery than REN, there was little difference in time. So for RO and REN are reflexes are important to indicate stunning, and then it is possible to combine the two methods as a strategy for assessing unconsciousness in Nile tilapia.

Keywords: dorsal fin, eye rotation, stunning, animal welfare, reflection.

1. Introdução

Na piscicultura como em outras atividades de cultivo, os produtores buscam máxima eficiência dos animais e conseqüentemente maiores quantidades de pescado produzido em menor período de tempo. Entretanto, com a intensificação da produção de peixes, o bem-estar animal, que funciona como parâmetro da qualidade de vida dos animais (Appleby, 1999), fica em segundo plano pela falta de conhecimento por parte dos produtores de que o bem-estar animal durante as etapas de criação agrega valor ao produto final (Poli et al., 2005). Apesar disso, existe legislação na maior parte dos países que engloba práticas de bem-estar para todos os animais de produção e de interesse econômico. Porém houve certo atraso na adequação para a piscicultura, devido ao pouco conhecimento sobre o assunto (Oliveira & Galhardo, 2007). Isso pode ser explicado pelo fato dos peixes serem filogeneticamente mais afastados dos humanos do que as outras espécies (Molento & Pont, 2010), pela dificuldade em entender os sinais comportamentais e por não haver nenhum tipo de comunicação sonora que indique seu estado mental (Pont & Molento, 2009).

A importância ética e moral acerca de melhores práticas de manuseio com peixes é crescente e positiva na comunidade científica e vem ganhando espaço entre os consumidores (Pedrazzani et. al, 2007). Dessa forma, os estudos sobre sensiência em teleósteos, ou seja, a capacidade de experimentar sensações conscientes e subjetivas, e sobre a aplicabilidade do bem-estar animal para essas espécies a partir dessa confirmação surgiram com o objetivo de minimizar sensações negativas que existem durante a interação humano-animal (Pedrazzani et al., 2008).

Podemos considerar a sensiência e o bem-estar legítimos e aplicáveis para peixes, julgando sua capacidade de percepção da dor, de elaborar respostas frente a experiências e de serem capazes de passar por estresse (Galhardo & Oliveira, 2006). Além disso, peixes apresentam alguns comportamentos similares aos outros vertebrados, como demonstrar aversão a estímulos que possam ser dolorosos, capacidade de aprendizado e plasticidade da memória (Braithwaite & Huntingford, 2004), bem como estruturas neurais como o telencéfalo que, quando é danificado de alguma forma, prejudica as conexões cognitivas, como aprendizado e memória de localização (Salas et. al., 1996). Isto ocorre com alguns

vertebrados quando o hipocampo sofre alguma alteração (Salas et. al.,1996). Portanto, a afirmação de que peixes tem função cerebral suficiente para sentirem dor e medo é admissível.

Na criação de peixes, vários fatores podem submetê-los a estresse e prejudicar seu bem-estar devido à necessidade de manejo intenso, que são reprodução, crescimento, agrupamento/transporte e abate (Bergqvist & Gunnarsson, 2013). Destes fatores podemos considerar como fase mais crítica e delicada o abate, pelo fato de provocar estresse agudo se houver incômodo no pré-abate e/ou no momento da morte. Este tipo de estresse, além de causar impacto negativo para os animais devido a dificuldade de enfrentar a situação, faz com que as características físico-químicas do pescado fiquem comprometidas, e a consequência disto é o aceleração do *rigor mortis* e tempo de prateleira reduzido (Nakayama et al.,1996). Então, é coerente o pensamento de que é preciso aplicar o conceito de abate humanitário na piscicultura comercial, que envolve métodos que promovam rápida insensibilização a fim de diminuir a dor e o sofrimento ou que providenciem morte imediata e indolor (Robb & Kestin, 2002). A escolha de métodos humanitários tem grande importância para evitar o sofrimento desnecessário dos animais e irá influenciar positivamente na qualidade do pescado. Dessa forma, o abate pode ser realizado primeiramente atordoando os peixes de maneira a deixá-los inconscientes. Posteriormente a morte deve ser provocada por meio de técnicas que impeçam os batimentos cardíacos, o acesso a oxigênio ou hemorragia (Lines et al., 2003).

Alguns estudos consideram plausível desvendar o estado mental durante a insensibilização com a união dos comportamentos autoiniciados, reflexos e reação a estímulos. Analisando a correlação desses parâmetros é possível ter informações sobre o estágio da inconsciência sem utilizar meios invasivos (Kestin et al., 2002).

Assim, encontrar indicador de insensibilização prático de ser visualizado e aplicado em campo ou linhas de abate pode auxiliar nas buscas por métodos humanitários de abate, além de fornecer mais dados sobre tempo de indução e recuperação. A partir disso, em observações comportamentais sob efeito anestésico em tilápia-do-Nilo, notamos o cessamento do reflexo de eriçamento da nadadeira dorsal. As nadadeiras são anatomicamente dispostas por segmentações ósseas ou cartilaginosas e os peixes tem amplo controle muscular

sob seus movimentos. Por isso, possuem importante função na navegação, gerando impulsos, auxiliando lateralmente durante a natação e provendo forças no momento das manobras para mudar a natação de sentido (Lauder & Drucker, 2004). Além da função hidrodinâmica, Giaquinto e Volpato (1997) o eriçamento da nadadeira dorsal de tilápias se caracteriza como ferramenta utilizada por indivíduos alpha na hierarquia social, em displays de agressividade.

Baseado nestas observações, o presente estudo investigou se, sob indução por termonarcole e narcole por dióxido de carbono, métodos comumente utilizados no abate comercial, esse reflexo clínico pode funcionar como indicador de insensibilização em tilápia-do-Nilo, visando auxiliar nas descobertas que minimizem o sofrimento nessa etapa.

2. Materiais e métodos

2.1 - Animais e condições de estoque

Adultos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759), foram obtidos de piscicultura comercial e mantidos em biotério climatizado durante o período experimental. No momento do experimento os animais tinham peso médio de $42,9 \pm 12,99\text{g}$ e tamanho aproximado de $13,85 \pm 1,39\text{cm}$. Os tanques em que os peixes foram alojados tinham capacidade para o volume de 6.000 litros de água, com pH em torno de 7, temperatura entre 25 e 27°C, equipados com aeração e renovação constantes, filtros biológicos, termostatos e sifonados frequentemente para controle de matéria orgânica. Os níveis de amônia (<0,5 ppm) e nitrito (<0.05 ppm) foram mantidos ideais para a espécie. O fotoperíodo a que os peixes foram expostos era de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e alimentação diária com ração comercial Nutripiscis SI crescimento 28 (28% de proteína).

2.2 - Delineamento experimental

Após observarmos que o reflexo de eriçamento da nadadeira dorsal (REN) (Figuras 2 e 3) de tilápia-do-Nilo cessa quando submetidos à anestesia com benzocaína, outros métodos comumente utilizados no abate comercial de peixes foram incorporados para testar a eficiência do reflexo em aferir insensibilização nos peixes. Além do REN, foi testado o reflexo de rotação ocular (RO) (Figuras 4 e 5), técnica já utilizada para sinalizar insensibilização. Através de movimentos manuais estimulávamos os reflexos nos peixes ao final de cada período de tempo.

Foram testados os seguintes grupos experimentais (figura 1): controle (n=14), benzocaína (n=14), termonarcole (n=30) e narcose por dióxido de carbono (n=20)

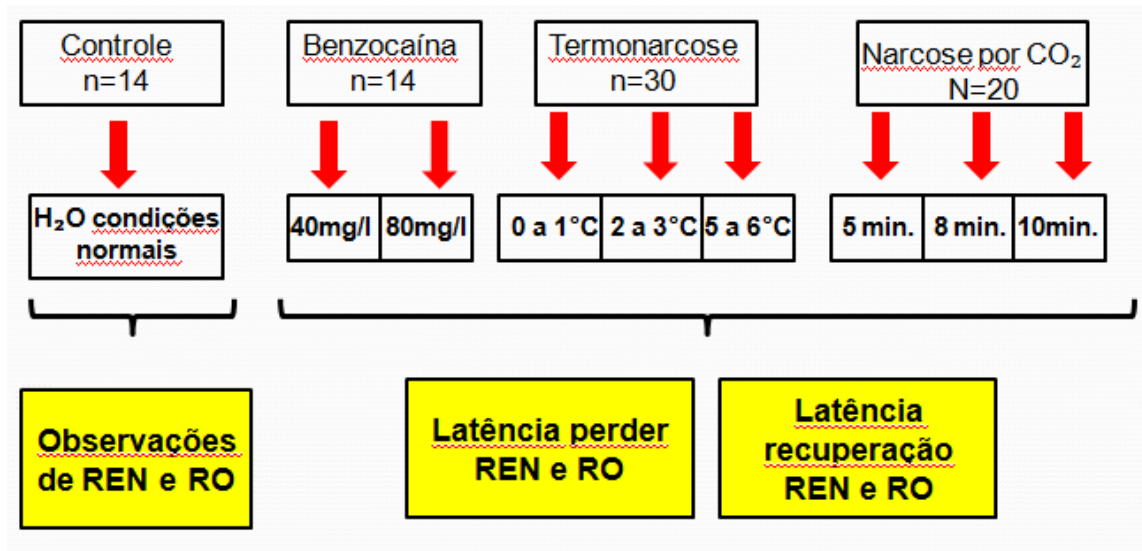


Figura 1 - Delineamento experimental.



Figura 2 – Presença do reflexo de nadadeira dorsal sem uso de anestésico.



Figura 3 - Ausência do reflexo da nadadeira dorsal sob indução anestésica por benzocaína.

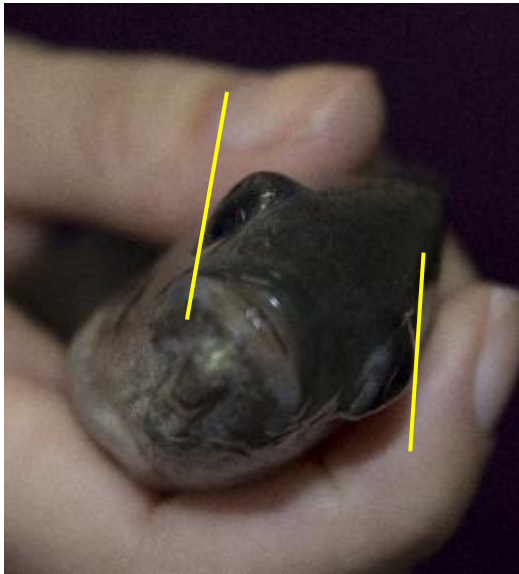


Figura 4 – Presença de rotação ocular sem uso de anestésico. As barras nas figuras indicam giro do eixo ocular em relação ao corpo.



Figura 5 – Ausência de rotação ocular sob indução anestésica por benzocaína. As barras nas figuras indicam giro do eixo ocular em relação ao corpo.

2.2.1– Procedimentos específicos

Deslocamos os peixes para aquários de vidro somente no momento dos experimentos e então, individualmente, cronometramos a latência de perda e recuperação dos reflexos nos animais sob benzocaína, termonarcole e narcole por dióxido de carbono. O estímulo manual pelo qual provocamos o eriçamento

da nadadeira dorsal consiste em girar as mãos 90 graus e/ou tocar a parte lateral média do corpo do peixe com os dedos rapidamente. Para conferir a rotação ocular giramos o peixe 180 graus com as mãos e observamos até os olhos “congelarem”, ou seja, até a rotação dos olhos parar em relação ao giro do eixo do corpo. Além dos reflexos, observamos também a latência até os peixes perderem a capacidade de corrigir a postura sob termonarcorese e narcose por dióxido de carbono a fim de relacionar a latência da perda de comportamento com a latência de perda dos reflexos.

2.2.2 – Controle e benzocaína

O controle (n=14) utilizado como referência para todos os tratamentos foi feito individualmente em aquário de 20 litros (40 x 23 x 25) com as condições da água normais, aeração constante e temperatura controlada em torno de 26°C. Com tempo cronometrado, a cada 1 min. retirávamos rapidamente os peixes para testar os reflexos por meio de estímulo manual e devolvíamos para a água em seguida. Esse procedimento foi repetido por 20 min. para cada peixe e os reflexos permaneceram estáveis durante o tempo e nas repetições.

Na anestesia por benzocaína (n=20), testamos os reflexos sob duas concentrações distintas, 40mg/l e 80mg/l e, de 1 em 1 minuto retirávamos os peixes da água para estimular os reflexos até constatarmos a ausência total de REN e RO. Em seguida os colocávamos em aquário aerado e com temperatura em torno de 26°C para a recuperação total dos reflexos e comportamentos. A sequência de eventos comportamentais apresentados durante a indução, como natação anormal e perda de equilíbrio foram observados e comparados aos comportamentos apresentados pelos peixes em termonarcorese e narcose por dióxido de carbono, a fim de usar essas medidas para assimilar as ações dos peixes com o anestésico e a outros tratamentos que funcionem como tal.

2.2.3 – Termonarcorese

Em termonarcorese (n=30) estabelecemos as seguintes faixas de temperatura: 0 a 1, 2 a 3 e 5 a 6 °C. Em aquário com capacidade para 6 litros (24 x 14 x 16) adicionamos gelo à água até chegar na temperatura desejada, sendo

todo o processo controlado por termômetro. Os peixes foram colocados na mistura, e, a cada 1 min. os retirávamos para estimular REN e RO. Quando detectávamos a ausência desses reflexos a contagem parava e o peixe era colocado num aquário em condições de estoque para a recuperação total. Observamos o tempo de perda de equilíbrio para posterior comparação com o tempo de perda dos reflexos.

2.2.4 – Narcose por dióxido de carbono

No tratamento com dióxido de carbono (n=20) estabelecemos três tempos diferentes. Numa capela equipada com aquário de 20 litros (40 x 23 x 25) contendo termômetro e tubo de plástico com pedra porosa de aeração na ponta ligado ao cilindro de dióxido de carbono, cada grupo de peixes passou por um dos 3 tempos estabelecidos para borbulhar, que foram 5, 8 e 10 min. Individualmente os peixes foram colocados no aquário e então abríamos o registro do cilindro para começar a borbulhar, na presença do peixe.

Após o tempo necessário, tirávamos os peixes para testar os reflexos e os colocávamos em aquário com as mesmas condições de estoque. A água do aquário foi trocada a cada intervalo de um peixe para outro para evitar acúmulos de gás e conseqüentemente interferir nos resultados. Durante o experimento, para quantificar a presença de CO₂ na água no momento da perda dos reflexos (tabela 1), amostras de água foram coletadas antes e depois de borbulhar e examinadas por meio de titulação com ácido sulfúrico, procedimento descrito por MACKERETH et al., 1978.

Tabela 1. Saturação da água por CO₂ livre e total ao longo do tempo.

Tempo(min)	0	5	8	10
Co ₂ Total (mg/L)	2,11 ± 1,17	24,69 ± 8,55	39,80 ± 8,89	40,50 ± 8,45
CO ₂ Livre (mg/L)	0,48 ± 0,12	23,69 ± 8,55	38,83 ± 8,89	39,50 ± 8,45

2.2.5 – Ética

Todos os procedimentos deste projeto foram aprovados pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais). Protocolo número 678.

2.3 Análises estatísticas

Com a finalidade de quantificar o número de indivíduos que perderam o reflexo e conferir confiabilidade, analisamos todos os dados dos experimentos pelo teste Kaplan Meier ou teste de sobrevivência (1958), estimador não-paramétrico que utiliza dados quantitativos e apresenta gráficos com distribuição do tempo até ocorrer o evento desejado, no caso a perda do REN e RO. As anotações dos dados para análise posterior foram feitas de forma que, quando o peixe ainda não tinha atingido o esperado, ou seja, continuou eriçando a nadadeira, fazíamos a marcação 1 para “eriçou a nadadeira”. No momento em que o indivíduo atingiu o evento esperado, que foi perder o reflexo, usamos a censura como 0 para “não eriçou a nadadeira”. Os dados obtidos para RO foram analisados da mesma maneira. Na recuperação, o evento esperado era que REN e RO fossem recuperados em algum momento. Então a censura 0 passou a ser usada para os indivíduos enquanto não voltaram a apresentar os reflexos e 1 para o momento em que os indivíduos se recuperaram totalmente.

3. Resultados

As curvas de sobrevivência que apresentaram diferenças significativas foram na perda ($p=0.0039$; Figura 6) e na recuperação ($p<0.0001$; Figura 7) de REN por benzocaína, na perda de RO por benzocaína ($p<0.0001$; Figura 8) na perda de REN por termonarose ($p<0.0001$; Figura 9), perda de RO por termonarose ($p=0.0002$; Figura 10) e perdas de REN e RO por narcose dióxido de carbono ($p=0.0013$; Figura 11). Os gráficos que não tiveram curvas significativamente diferentes foram a recuperação de RO ($p=0.2697$) por benzocaína, recuperação de REN ($p=0.7422$) e RO ($p=0.2620$) por termonarose e recuperação de REN e

RO em narcose por dióxido de carbono ($p=1.0000$). As barras presentes nos gráficos indicam erro padrão em função da variação do tempo.

Em relação ao comportamento de perda de postura vertical sob termonarcose, os peixes perderam a postura antes dos reflexos em todos os grupos testados. O mesmo ocorreu para os animais submetidos à narcose por dióxido de carbono (tabela 2).

Tabela 2. Tempo médio dos grupos testados até a perda de postura vertical, REN e RO sob termonarcose e narcose por CO₂ em minutos.

	Termonarcose (0 a 1,2 a 3 e 5 a 6°C)	Narcose por CO ₂ (5, 8 e 10 min.)
Postura vertical	1,70 min.	4 min.
REN	3,80 min	8 min.
RO	3,45 min.	10 min.

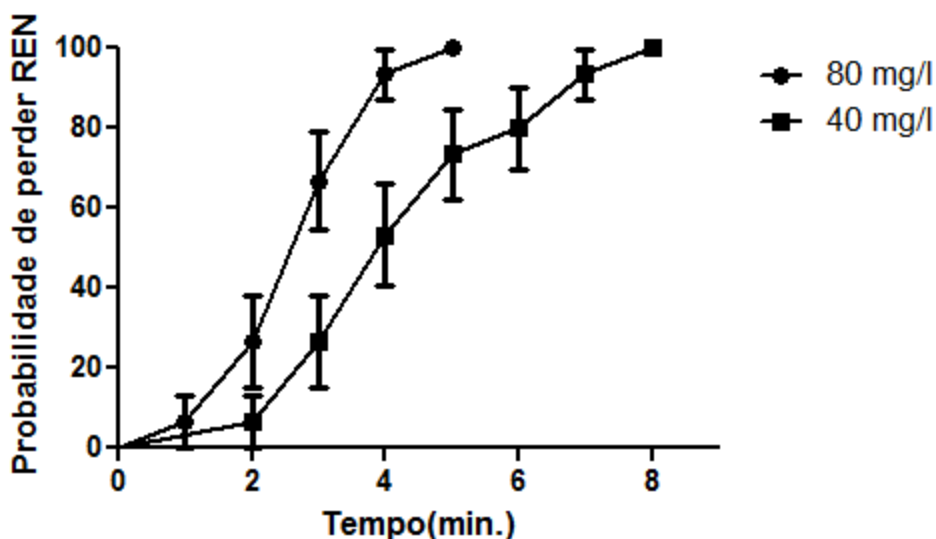


Figura 6 – Tempo estimado para que de todos os indivíduos testados percam REN sob indução anestésica por benzocaína (n=14).

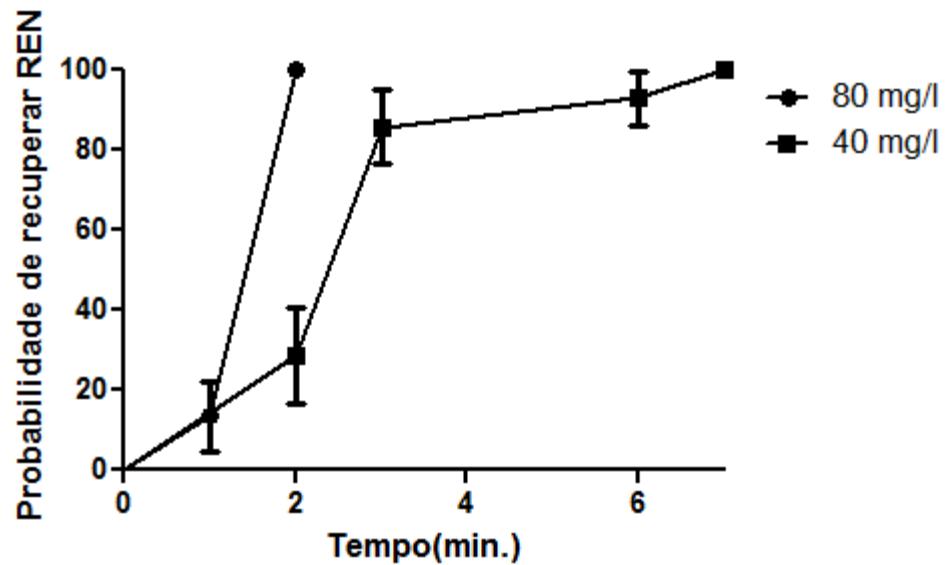


Figura 7 – Tempo estimado para que todos os indivíduos recuperem o REN em condições de água normal, sem a presença de substância anestésica (n=14). Os peixes submetidos a 40mg/l ficaram expostos por mais tempo ao anestésico, pois demoraram a perder os reflexos. Isso fez com que a recuperação desse grupo fosse mais lenta do que 80mg/l.

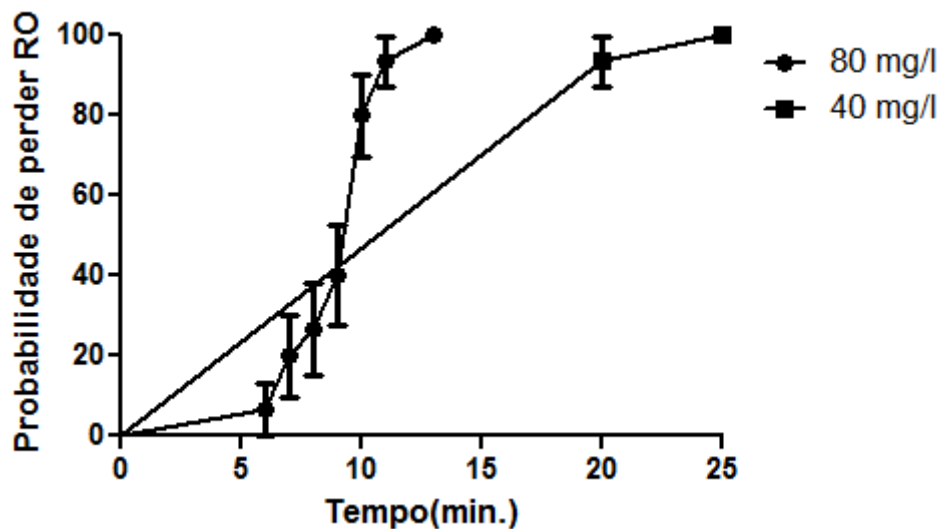


Figura 8 – Tempo estimado para que todos os peixes percam RO sob indução anestésica por benzocaína (n=14).

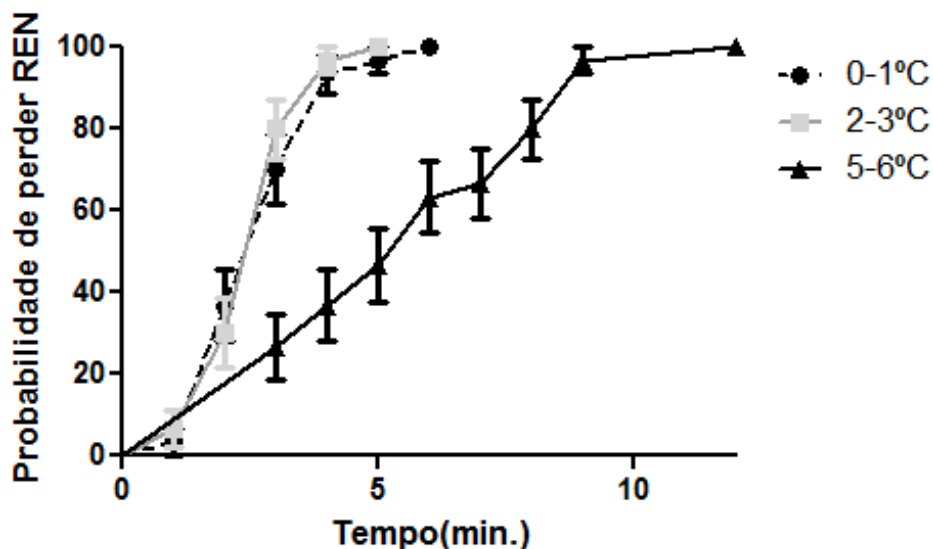


Figura 9 – Tempo estimado para a perda de REN sob termonarcole (n=30). O grupo submetido à faixa de temperatura 5 a 6 °C demorou mais para perder o reflexo.

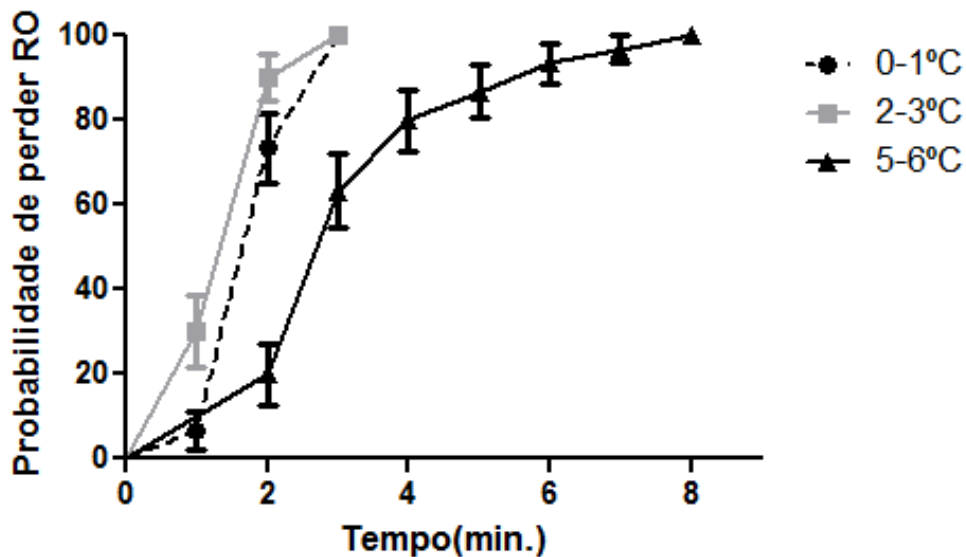


Figura 10 – Tempo estimado para a perda de RO sob termonarcole (n=30). O grupo submetido à faixa de 5 a 6 demorou mais tempo para perder o reflexo.

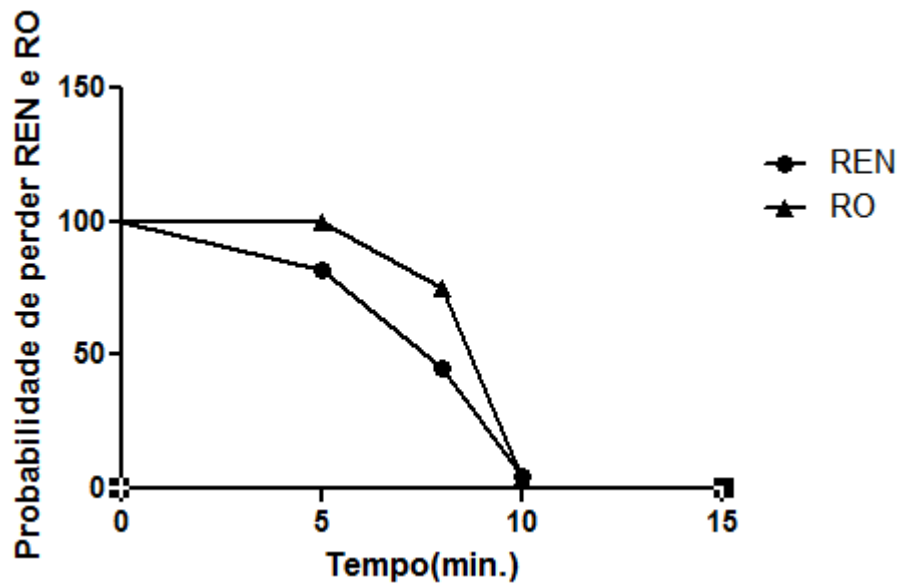


Figura 11 – Tempo estimado para a perda de REN e RO sob narcose por dióxido de carbono nos tempos 5, 8 e 10 min. (n=20). A maior parte dos peixes perdeu REN e RO no momento 10 min.

4. Discussão

O objetivo desse estudo foi validar um reflexo que possa ser indicativo de insensibilização para peixes e assim contribuir para que o sofrimento no momento da morte seja reduzido. Nossos resultados sugerem que o REN em tilápias pode ser indicativo de insensibilização, e, apesar de ser um pouco mais sensível do que RO, que cessa em menor tempo durante a indução e tem recuperação mais lenta do que REN, a diferença de tempo não chega a ser discrepante.

Para mamíferos e aves, as respostas obtidas dos reflexos corneal e respiratório são consolidadas para atestar função cerebral. Sendo assim, reflexos são bem aceitos para aferir se o animal está consciente ou não e qual o melhor momento para o abate sem dor (Gregory, 1987; Anill, 1991). Desta forma, é coerente o uso de REN para auxiliar no diagnóstico de insensibilização em tilápia-do-Nilo.

Comportamentos auto iniciados, como a capacidade de manter o equilíbrio durante a anestesia por termonarcese cessam antes das reações reflexas, como REN e RO (Kestin et al, 2002). Desse modo, para tilápia-do-Nilo obtivemos resultados que colaboram com essas informações, sendo que, para os grupos 0 a 1, 2 a 3 e 5 a 6°C, a média de tempo até a perda de postura vertical dos peixes foi de, em média 1,73 min. e as médias de tempo para perda de REN e RO foram, respectivamente 3,8 min. e 3,45 min. Para dióxido de carbono, Kestin et al, 2002 descrevem em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) que as perdas de comportamentos auto iniciados e reflexos ocorreram praticamente ao mesmo tempo, diferentemente do que observamos neste experimento, em que para o grupo dióxido de carbono (borbulhando 5, 8 e 10 min.) a perda de equilíbrio para a maior parte dos peixes ocorreu, em média, com 4 min., REN com 8 min. e RO com 10 min. Isto pode ser explicado por diferenças na saturação do gás na água, espécie do peixe e tipo do equipamento usado.

Os gráficos mostram os tratamentos aplicados que tiveram maior rapidez em agir na perda dos reflexos, que foram o grupo 80mg/l de benzocaína e as temperaturas 0 a 1 e 2 a 3°C que foram similares, porém bastante diferentes de 5 e 6°C. Para o grupo dióxido de carbono, o tempo de 10 minutos foi o mais efetivo

em provocar a perda de RO e REN na maioria dos indivíduos. Portanto, a maior parte dos peixes perdeu os reflexos em determinado momento dos testes.

Quando os peixes são submetidos à termonarçose, não fica claro observar a gama de comportamentos exibidos durante a indução, já que ocorre a paralisia muscular, o que poderia mascarar se o peixe está consciente, devido a imobilidade (Robb & Kestin, 2002). Em nossos resultados, houve rápida imobilidade dos peixes ao serem colocados no aquário com gelo. A perda de postura vertical ocorreu em segundos nas temperaturas mais baixas testadas, ainda mais pelo fato de a tilápia-do-Nilo ser aclimatada a temperaturas mais quentes. Apesar disso, a perda dos reflexos não ocorreu imediatamente após colocarmos os animais na água, e então continuamos estimulando os reflexos até a perda total de REN e RO para podermos afirmar com mais certeza que o peixe alcançou o estágio desejado.

O eriçamento da nadadeira dorsal é reflexo clínico facilmente observado em tilápias, e então, corroborando com Kestin et al., 2002 no monitoramento da linha de abate, o profissional responsável por atestar se os procedimentos de insensibilização e abate estão corretos pode usar o método da nadadeira dorsal combinado com a rotação ocular. Se o peixe não apresentar nenhum destes reflexos, podemos considerá-lo insensibilizado. Para facilitar o uso de REN durante os procedimentos de abate, pode ser feita amostragem nos lotes que chegam ao frigorífico, e, dessa forma após testar em alguns animais, o restante pode ser insensibilizado e abatido da mesma forma. Além disso, o reflexo da nadadeira dorsal é mais facilmente observado do que a rotação ocular, pois para estimular a rotação ocular é necessário girar os peixes, e normalmente peixes ideais para abate são pesados. Já para a nadadeira, aproveitando sua função hidrodinâmica, movimentando o peixe para alguma direção ou virando-o lateralmente o forçará a “corrigir o percurso”, e então provavelmente aparecerá o reflexo da nadadeira.

Podemos sugerir mais estudos sobre REN, como descobrir se o reflexo é ativado por via cerebral ou medular. Isto talvez possa ser feito monitorando a função cerebral enquanto partes da base da nadadeira dorsal são lesadas. Esse reflexo pode auxiliar nas buscas pelo método ideal de abate humanitário para peixes, que ainda não foi bem estabelecido.

5. Referências bibliográficas

Anil, M. H. Studies on the Return of Physical Reflexes in Pigs following Electrical Stunning. *Meat Science* 30, 13-21, 1991.

Appleby, M. What should we do about animal welfare? Oxford: Blackwell Science, 1999.

Bergqvist, J., Gunnarsson, S. Finfish Aquaculture: Animal Welfare, the Environment, and Ethical Implications. *J Agric Environ Ethics* 26:75–99, 2013.

Braithwaite, V. A., Huntingford, F. A. Fish and welfare: Do fish have the capacity for pain perception and suffering? *Animal Welfare*, Volume 13, Supplement 1, pp. 87-92, 2004.

Galhardo, L., Oliveira, R. Bem-estar Animal: um Conceito Legítimo para Peixes? *Revista de Etologia*, Vol.8, N°1, 51-61. 2006.

Giaquinto, P. C., Volpato, G. L. Chemical Communication, Aggression, and Conspecific Recognition in the Fish Nile Tilapia. *Physiology & Behavior*, Vol. 62, No. 6, pp. 1333–1338, 1997.

Gregory, N. G. Determination of impaired brain function in animals in the laboratory. In *Pre-slaughter Stunning of Food Animals*. Eds H. E. Carter, V. R. Carter. Horsham, European Conference Group on the Protection of Farm Animals. pp. 2- 16, 1987.

Kestin,S.C.,Van de vis,J.W.,Robb, D.H.F. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. *Veterinary Record*, 302-307, 2002.

Lauder, G.V., Drucker, E. G. Morphology and experimental hydrodynamics of fish fin control surfaces. *IEEE Journal of oceanic engineering* , vol. 29, no. 3, 2004.

Lines, J.A., Robb, D.H.; Kestin, S.C., Crook, S.C. and Benson, T. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. *Aquacult Eng.*, 28: 141-154, 2003.

Mackereth, F.J.H., Heron, J. & Talling, J.F. Water analysis: some revised methods for limnologists. Freshwater Biological Association, Scientific Publication Number 36. The Ferry House, Ambleside, Cumbria, England. p. 120. 1978.

Molento, C. F. M.; Pont, G. D. Diagnóstico de bem-estar de peixes. *Ciênc. vet. tróp.*, Recife-PE, v. 13, suplemento 1, p. 6-11, 2010.

Nakayama T, Toyoda T, Ooi A. Delay in rigor mortis of red sea-bream by spinal cord destruction. *Fisheries Sci* 62 (3):478-482. 1996.

Oliveira, R. F., Galhardo, L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, suplemento especial, p.77-86, 2007.

Pedrazzani, A. S., Molento, C. F. M., Carneiro, P. C. F., Castilho, M. F. Senciência e bem-estar de peixes: Uma visão de futuro do mercado consumidor. *Panorama da AQUICULTURA*, 2007.

Pedrazzani, A.S., Molento, C.F.M., Carneiro, P.C.F., Castilho, M. F. Opinião pública e educação sobre abate humanitário de peixes no município de Araucária, Paraná. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n.4, p. 976-983, 2008.

Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., Zampacavallo, G. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*. 13: 29–49, 2005.

Pont, G. D. ; Molento,C.F.M. Bem-estar de peixes utilizados para consumo. In: V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes - Anais - Palestras, 2009. Anais do V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes - Anais, p. 10-13, 2009.

Robb, D.H.F.; Kestin, S.C. Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. *Animal Welfare*, v.11, n.3, p. 269-282, 2002.

Salas, C.; Broglio, C.; Rodriguez, F., López, J.C., Portavella, M., Torres, B. Telencephalic ablation in goldfish impairs performance in a 'spatial constancy' problem but not in a cued one. *Behavioural Brain Research*, v.79, p.193-200, 1996.