



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL



USO DE SULFATO DE CÁLCIO COMO REDUTOR DE
ESTRESSE NO TRANSPORTE DE MATRINXÃS (*Brycon
cephalus*)

FABIANO BENDHACK

Zootecnista

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

USO DE SULFATO DE CÁLCIO COMO REDUTOR DE
ESTRESSE NO TRANSPORTE DE MATRINXÃS (*Brycon
cephalus*)

Fabiano Bendhack

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

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aqüicultura, do Centro de
Aqüicultura da UNESP, Campus
de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do
título de MESTRE em
AQÜICULTURA, Área de
concentração em Aqüicultura em
Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo - Brasil
2004

Agradecimentos

À Beth, grande professora e amiga, exemplo de dedicação naquilo que faz. Ensinou-me aprender com os erros, a não perder oportunidades e a não poupar esforços para uma tarefa, porque sempre que errei você me falou "vamos ver o que está acontecendo...", quando apareciam oportunidades você dizia "vamos encarar?" e quando eu deixava para a última hora, você sempre falou "só saímos daqui quando terminarmos" sem importar a hora ou o dia. Obrigado orientadora!!!

Aos meus pais, Beto e Sandra e minhas irmãs Ju e Tati, pela força, apoio e torcida, que mesmo distante fisicamente, sempre estiveram presentes me incentivando durante esta fase da minha vida.

Aos grandes amigos, Tia Lu e Tio Benê, por todas as ajudas: acadêmicas, financeiras e pessoais, vocês colaboram muito na minha formação com o exemplo de profissionais que são.

Aos amigos Miguel e Ana Isabel, que foram as pessoas que nos momentos mais difíceis estavam sempre ao meu lado para incentivar e não deixar chegar o baixo astral, vocês foram meus irmãos.

À Damares pelo apoio técnico, ensinamentos e pela convivência pessoal.

Ao amigo Paulo Carneiro, pelas portas que abriu na minha vida profissional, pelos ensinamentos, sugestões neste trabalho, e pela convivência pessoal.

Aos Professores Flávio Ruas, João Batista e Masé pela contribuição como banca de defesa e qualificação deste trabalho.

Ao grande companheiro Flavião por estar sempre junto tanto nas horas do trabalho como nas cervejinhas.

Ao pessoal que está ou passaram pelo Grupo de fisiologia de peixes especialmente para Roquinho, Richard, Gaúcho, Lu, Léo, Leda, e Janessa que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal da graduação do Grupo de fisiologia de peixes Paula, Rodrigo, Jaque, Márcio, Monyka, Sumô, Bruna, Casé.

Aos professores, funcionários amigos e colegas do CAUNESP que contribuíram com este trabalho.

Aos professores, funcionários amigos e colegas do Departamento de fisiologia e morfologia animal que contribuíram com este trabalho.

Dedicação

Dedico este trabalho à minha eterna namorada Ana Paula pela cumplicidade em todos os momentos.

"Ana, você me compreendeu até nos momentos em que eu mesmo não me compreendia. Você esteve sempre presente nas horas que eu precisava. Esta etapa da minha vida foi mais fácil porque você esteve junto comigo. Muito obrigado pela força!!!"

ÍNDICE

Resumo.....	02
Abstract.....	04

Capítulo I

Transporte de matrinxã e o uso de substâncias redutoras de estresse

Introdução.....	07
Matrinxã.....	07
Transporte.....	07
Estresse no transporte.....	08
Estresse conceito e mecanismo.....	08
Estrutura Branquial.....	10
Homeostase hidromineral.....	11
Referências Bibliográficas.....	14

Capítulo II

Uso de sulfato de cálcio como redutor de estresse no transporte de matrinxãs

Introdução	19
Material e métodos.....	21
Resultados.....	24
Discussão.....	35
Referências Bibliográficas.....	41

Capítulo III

Conclusões e Implicações.....	46
-------------------------------	----

RESUMO

O sulfato de cálcio (CaSO_4) ou gesso agrícola é utilizado na piscicultura para minimizar as respostas de estresse durante o transporte. O objetivo deste estudo foi testar sua eficiência no transporte de 4 horas de matrinxãs juvenis. Após 48 horas de jejum, os peixes ($200,21\text{g} \pm 51,12\text{g}$) foram embalados em sacos plásticos (125g L^{-1}) (cinco sacos por tratamento), sendo um amostrado 15 minutos após a embalagem e 4 transportados em água contendo CaSO_4 (0, 75, 150, 300 mg L^{-1}). Foi retirada uma amostra de água das embalagens para avaliação do oxigênio dissolvido, pH, amônia, dureza, alcalinidade e íons cálcio. Amostras de sangue sem anticoagulante foram retiradas antes do transporte (nível inicial), após a embalagem, na chegada, 24 e 96 horas depois (recuperação). O soro foi separado para análise de cortisol, cloreto, sódio, potássio, cálcio e sangue heparinizado foi utilizado para avaliação do hematócrito, número de eritrócitos, número de leucócitos, volume corpuscular médio e hemoglobina no sangue total. No plasma foram dosados glicose e osmolalidade. Foram amostrados 8 peixes (repetições) (2 em cada caixa) antes do transporte e na recuperação, 8 em cada saco plástico após serem embalados e 8 (2 por saco plástico) após o transporte. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Peixes de todos os tratamentos apresentaram aumento de cortisol após a embalagem (controle $p < 0,05$; demais $p < 0,01$) e na chegada na qual diminuiu nos peixes transportados com sulfato de cálcio. A glicemia aumentou após o transporte nos peixes de todos os tratamentos, sem diferença entre eles. Após 24 e 96 horas, diminuiu atingindo valores menores que os de antes do transporte. Após a embalagem, o cloreto mostrou tendência a queda nos tratamentos com sulfato de cálcio, o que acentuou na chegada nos peixes transportados sem sulfato e com as

duas concentrações mais baixas. Com 300 mg L^{-1} , os níveis de cloreto foram mantidos em valores semelhantes aos iniciais. O sódio apresentou um perfil semelhante, mas com diferenças menores. Os valores de potássio sérico apresentaram tendência de diminuição inversamente relacionada à concentração de cálcio na água retornando aos valores iniciais 24 horas depois. O cálcio sérico não diferiu entre os tratamentos. O hematócrito foi maior em todos os tratamentos após a embalagem e na chegada, com exceção dos peixes transportados na maior concentração de CaSO_4 . O número de eritrócitos acompanhou este perfil. No tratamento 75 mg L^{-1} , na chegada, o volume corpuscular médio foi maior que o nível inicial. A taxa de hemoglobina não diferiu entre os tratamentos e o número de leucócitos aumentou 24 horas depois da chegada nos tratamentos 75, 150 e 300 mg L^{-1} . Os resultados indicam que a adição de CaSO_4 na água de transporte pode reduzir as respostas de estresse do matrinxã.

ABSTRACT

The calcium sulfate or agricultural gypsum is used in aquaculture to reduce the stress responses during transportation, and the aim this study was to test its efficiency in 4h transport of matrinxã juveniles. After 48h in 500L aquaria, fasted fish ($200.21\text{g} \pm 51.12\text{g}$) were transported for 4h in plastic bags (125g L^{-1}) (five bags per treatment). One bag was sampled 15 min after package and the other were transported in water containing different CaSO_4 concentrations: 0, 75, 150, 300 mg L^{-1} . Water samples of each treatment were evaluated: dissolved oxygen, pH, ammonia, hardness, alkalinity and calcium ions. Blood was collected before transport (initial value), after packing, after transport and 24 and 96 h later (recovery). Cortisol, chloride, sodium, potassium, calcium were determined in serum and hemoglobin. Red and white blood cells count, mean corpuscular volume, hematocrit, plasma glucose and osmolality were determined in eight fish (replicates) (2 fish per aquaria) before transport and recovery. Data were analyzed by ANOVA and means compared by Tukey test. Cortisol increased after package (control $p < 0.05$; others $p < 0.01$), but decrease after transport in fish transported with calcium sulfate. Glucose increased after transport in fish of all treatments and during recovery it decreased to values lower than those registered before transportation. After package the chloride levels showed tendency to decrease in treated fish, which elevating at arrival in control and in the two lowest concentration groups. In fish transported in 300 mg L^{-1} , the chloride values were maintained similar to the initial levels. Sodium showed similar profile. Potassium presented tendency to decrease inversely to the concentration of calcium in the water and returned to initial values 24 h after. The serum calcium did not differ among treatments. Hematocrit was higher in fish of all treatments after package and arrival, except for fish transported in the highest concentration of CaSO_4 . Erythrocyte

number repeated this profile. In treatment 75 mg L⁻¹, the mean corpuscular volume after transport was higher than that registered before transport. Hemoglobin did not differ among treatments and leukocyte number increased after 24h in 75, 150, 300 mg L⁻¹. These results indicate that the addition of CaSO₄ in transportation water may reduce the stress responses in matrinxã.

CAPÍTULO I

TRANSPORTE DE MATRINXÃ E O USO DE
SUBSTÂNCIAS REDUTORAS DE ESTRESSE

INTRODUÇÃO

Matrinxã

O matrinxã, *Brycon cephalus* é originário da bacia amazônica, e apresenta bom potencial para a aquicultura pelo seu rápido crescimento, aceitação pelo consumidor e esportividade na pesca. Esta espécie tem presença obrigatória nos pesqueiros da região sudeste, na qual o mercado da piscicultura está muito ligado ao da pesca esportiva. Pesquisas envolvendo o matrinxã, como reprodução (Carvalho, 2001; Sanabria, 2002; Camargo; 2003), larvicultura (Vasquez, 2003), engorda (Mendonça, 1993) e transporte (Urbinati & Carneiro 2001; Carneiro & Urbinati 2001; Carneiro *et al.*, 2002) vem sendo feitas afim de aperfeiçoar os métodos de produção. O matrinxã é sensível ao manuseio e susceptível ao estresse, fato que tornou esta espécie um modelo em estudos de estresse.

Transporte

O transporte pode ser feito em diversos sistemas. Os mais utilizados são caixas com suprimento de O₂ ou sacos plásticos fechados, com adição prévia de oxigênio. A utilização de um ou outro varia de acordo com o tamanho, valor e quantidade de peixes, além da distância e meio de transporte. O transporte em sacos plásticos, geralmente é utilizado para peixes menores, ou distâncias maiores, quando é necessário o uso de aviões (Swann, 1992). É recomendado que o volume de água nos sacos ocupem no máximo 25% do espaço disponível e o restante seja ocupado com oxigênio. O sucesso do transporte se dá quanto mais alta for a densidade de transporte, para obtenção de maior lucro do transportador, e melhor a condição fisiológica dos animais na chegada, não havendo prejuízo ao comprador.

Estresse no transporte

O estresse está presente em todas as fases envolvidas no procedimento do transporte. No período de jejum, os animais precisam disponibilizar energia extra-alimentar para manutenção. Na captura, ocorre gasto excessivo de energia decorrente da perseguição e a seguir os peixes são submetidos à exposição ao ar, durante a contagem e transferência para as embalagens. Diversos artigos relatam aumento das respostas fisiológicas ao manejo durante a embalagem (Carmichael *et al.*, 1983; Forsberg *et al.*, 2001; Urbinati *et al.*, 2003). Durante o transporte em sistemas fechados, outros fatores como acondicionamento em alta densidade, movimento irregular e água com elevada concentração de amônia e outras toxinas resultantes do metabolismo, atuam como agentes estressores.

Estresse: conceito e mecanismo

Estímulos adversos influenciam o estado fisiológico normal dos peixes e geram respostas que dependendo do tipo, duração e severidade pode ocorrer em três fases. A primeira é a reação de alarme, percepção da situação e início das manifestações orgânicas; a segunda é o estágio de adaptação e resistência aos efeitos negativos dos estímulos. Durante a segunda fase, o organismo tende a compensar as condições adversas aumentando a utilização de reservas energéticas. Representam os efeitos terciários do estresse a diminuição do crescimento (Weil *et al.*, 2001), da resistência a doenças (Robertson *et al.*, 1987), e da capacidade reprodutiva (Morgan *et al.*, 1999). Quando a capacidade de regular os mecanismos homeostáticos se esgota pela duração dos estímulos, a saúde dos peixes pode estar comprometida (Eddy, 1981).

Na resposta primária, segundos após o estímulo, o sistema nervoso simpático estimula diretamente as células cromafins que liberam catecolaminas (especialmente adrenalina) com função de aumentar os batimentos operculares, estimular o fluxo de sangue nas brânquias e aumentar a capacidade de transporte de oxigênio (Fabbri *et al.*, 1998) além de disponibilizar glicose rapidamente. Ao mesmo tempo, a hipófise estimulada pela secreção de CRH (hormônio liberador de corticotrofina) do hipotálamo, libera ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) na corrente sangüínea que por sua vez, provoca a liberação de cortisol nas células secretoras do rim cefálico (Barton & Iwama, 1991). Nessas condições a hiperglicemia, induzida inicialmente pelas catecolaminas, é resultante de glicogenólise hepática. Sua manutenção ocorre graças a mecanismos neoglicogênicos resultantes do aumento da concentração plasmática de cortisol, sendo esta uma importante resposta secundária ao estresse (Mommensen *et al.*, 1999). A hiperglicemia tem o papel de proporcionar energia para os peixes na fuga ou enfrentamento da situação adversa (Wendelaar Bonga, 1997). Outro subsídio para tais respostas é a captação de maior quantidade de oxigênio, através do aumento dos batimentos cardíacos e operculares. Ao mesmo tempo em que ocorre maior ventilação, os hormônios liberados atuam sobre o epitélio branquial provocando aumento na sua permeabilidade, causando desequilíbrio osmótico nos peixes de água doce.

Dentre as estratégias hematológicas para aumentar o fornecimento de O_2 para o organismo, está o estímulo à troca Na^+/H^+ e a inibição da Cl^-/HCO_3^- , através da membrana de eritrócitos. Isto resulta na diminuição do pH plasmático e alcalinização do citoplasma, aumentando a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (efeito Root). Outra forma de aumentar o carreamento de oxigênio é o recrutamento

de novos eritrócitos através da contração do baço por efeito adrenérgico. (Gilmour, 1997).

A quantidade de leucócitos também fornece boa indicação do estado de saúde do peixe. A redução do número de linfócitos normalmente é considerada como resposta de estresse, visto que o cortisol atua como bloqueador de interleucina (Chen *et al.*, 2002). Todas essas alterações consomem energia e no momento em que se esses estímulos se tornam crônicos a tendência é acontecerem os efeitos terciários.

Estrutura branquial

Cada arco branquial dos teleósteos é constituído de múltiplos filamentos, subdivididos em milhares de lamelas, onde ocorrem as trocas iônicas e gasosas. O fluxo de água que irriga as brânquias corre no sentido inverso ao do sangue que passa pelas lamelas, maximizando os gradientes gasosos e osmóticos. Isto aumenta a eficiência das trocas gasosas, mas também aumenta o fluxo de íons cuja homeostase os peixes precisam manter (Evans *et al.*, 1999) (Fig. 1). O epitélio branquial (lamelas) é formado por 3 tipos principais de células: células de muco que produzem uma fina camada de muco, formando um meio intermediário entre água e epitélio; células pavimentares que são as células mais numerosas do epitélio branquial (90% da constituição) e que desempenham a função de troca dos gases O_2 e CO_2 ; e células de cloreto, que são caracterizadas pela alta atividade metabólica na regulação osmótica (Lin & Randall, 1995). Deve ser destacado que as junções entre as células pavimentares e as de cloreto, agem com eficiência no controle iônico limitando a perda de íons e ganho de água (Sardet, 1980). A estrutura branquial sofre modificações tanto por ação física dos estressores como pela troca

brusca de salinidade, temperatura e pH, e por efeito dos hormônios envolvidos nas respostas ao estresse, como as catecolaminas e o cortisol. Os efeitos mais comuns são a necrose epitelial, associada ao fenômeno da dilatação celular, elevação do tegumento causando infiltração de água pelos espaços intercelulares, hipertrofia e hiperplasia do epitélio respiratório e das células de cloreto. Estes efeitos provocam distúrbios na homeostase iônica e na regulação ácido/base (Mallat, 1985).

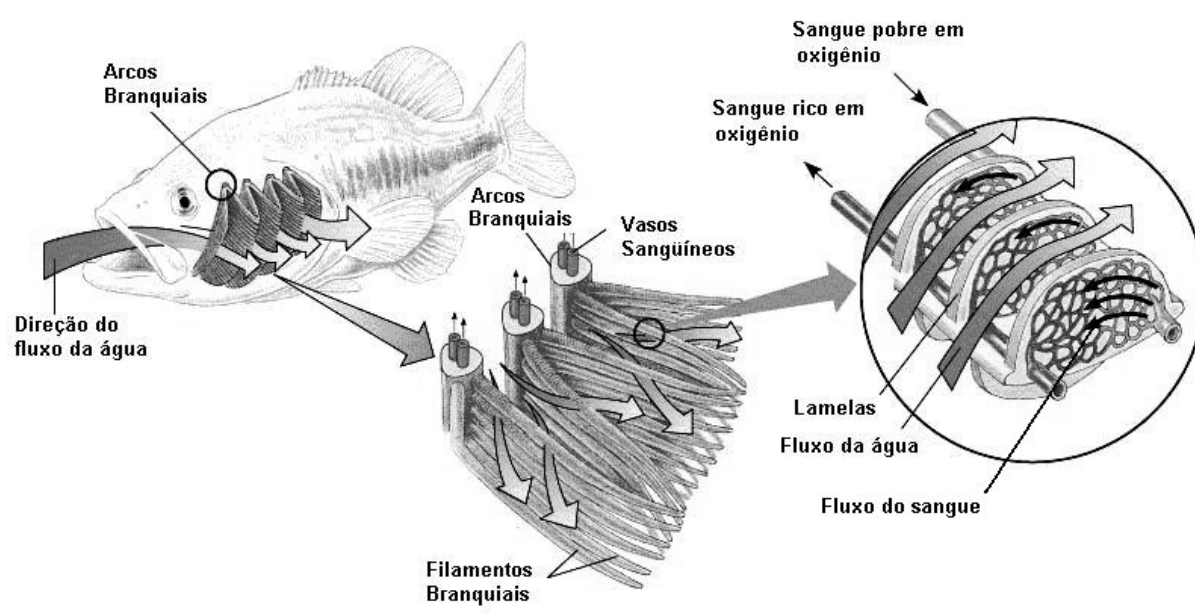


Figura 1: Estrutura branquial mostrando os arcos, filamentos e lamelas branquiais, com detalhe no sentido contrário do fluxo da água em relação ao do sangue (Adaptado de Staal, 2002).

Homeostase hidromineral

A concentração de sais no sangue de peixes adaptados à água doce é 100 vezes maior que a encontrada na água. A constante entrada de água e perda de íons como Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} são compensados através da excreção de grandes volumes de urina diluída e captação dos íons perdidos por mecanismo ativo das células de cloreto. As trocas branquiais mantêm o balanço ácido-básico ($\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ e

Na^+/H^+) e a excreção de resíduos nitrogenados ($\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$). A captação de Na^+ e Cl^- nos peixes é independente uma da outra e é realizada trocando estes íons por outros não desejáveis ao organismo, como NH_4^+ , HCO_3^- ou H^+ (Evans *et al.*, 1999). Na membrana basolateral, há uma bomba de Na^+/K^+ , que cria um gradiente favorável a entrada de sódio (membrana apical) em sistema de antiporte, eliminando a amônia ionizada (NH_4^+) ou H^+ . O Cl^- é trocado na membrana apical pelo HCO_3^- , resultado da hidratação do CO_2 da respiração pela anidrase carbônica (enzima catalisadora do processo).

A entrada do cálcio se dá através de difusão pela formação do gradiente osmótico da bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Flik & Verbost, 1993) (Fig. 2).

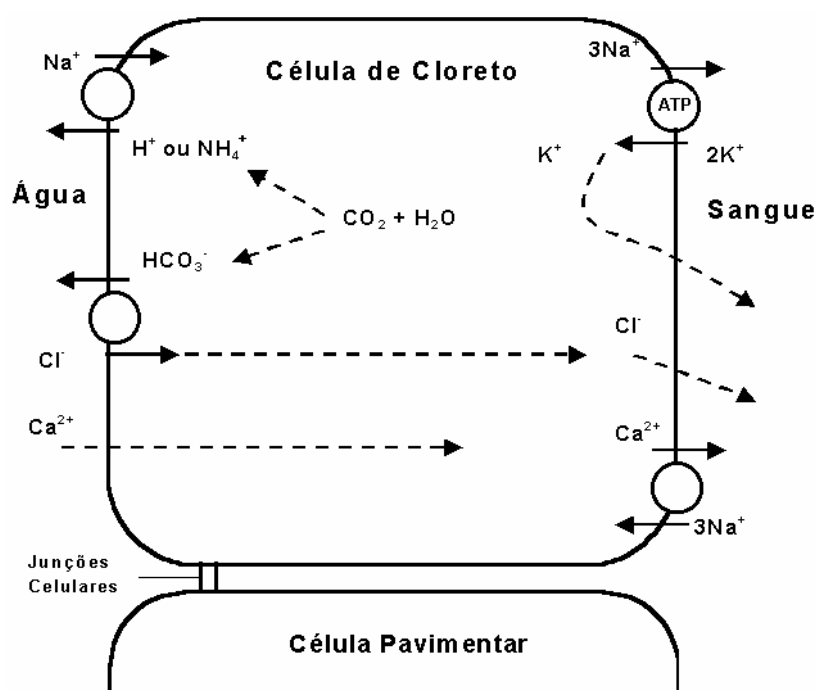


Figura 2: Fluxo de íons nas células epiteliais das brânquias de peixes adaptados a água doce.

Os distúrbios hidrominerais são importantes aspectos do estresse nos peixes e estão ligados à diferença osmótica entre o animal e o ambiente e à permeabilidade

do epitélio branquial. A diminuição dos gradientes pode reduzir o impacto dos estressores, como demonstrado por Carneiro & Urbinati (2001) e Gomes *et al.* (2003) que utilizaram sal (NaCl) na água de transporte em concentrações próximas às plasmáticas em peixes tropicais. O cálcio na água reduz a permeabilidade das membranas e junções celulares, controlando a perda de íons nos momentos de estresse (McDonald & Robinson, 1993). Embora a utilização de sais de cálcio na água de transporte de *Morone saxatilis* não tenha diminuído as respostas de estresse (Mazik *et al.*, 1991), existe a indicação da utilização de CaSO_4 (150 mg L^{-1}) em água de transporte com dureza inferior a 90 mg L^{-1} (Kubitza, 1997).

Existem muitos estudos sobre o uso de substâncias adicionadas na água de transporte de peixes vivos, sendo poucos os que definem a eficiência do cálcio, razão que levou a execução deste trabalho que avaliou a influência da adição de CaSO_4 na água de transporte de matrinxãs, no estado fisiológico após ser embalado, transportado e na sua recuperação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Reviews of Fish Disease* 1, 3-26.
- Camargo, A. C., 2003. Efeito da restrição alimentar no desempenho reprodutivo de fêmeas de matrinxã *Brycon cephalus*. Tese, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP. 84p
- Carmichael, G.J., Wedemeyer, A., McCraren, J.P., Millard, J.L., 1983. Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Progressive Fish-Culturist* 45(2), 110-113.
- Carneiro, P.C.F., Martins, M.L., Urbinati, E.C., 2002. Effect of sodium chloride on physiological responses and the gill parasite, *Piscinoodinium* SP., in matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleostei: Characidae) subjected to transport stress. *Journal Aquaculture in the Tropics* 17(4), 337-348.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research* 32, 297-304.
- Carvalho, E.G., 2001. Redução na oferta de ração: Metabolismo energético e na maturação gonadal do matrinxã (*Brycon cephalus*, TELEOSTEI: Characidae) em cativeiro. Tese, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP.
- Chen, W.H., Sun, L.T., Tsai, C.L., Song, Y.L., Chang, C.F., 2002. Cold-stress induced the modulation of catecholamines , cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte Phagocytosis in tilapia. *General and Comparative Endocrinology* 126, 90-100.
- Eddy, F.B., 1981. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: Pickering, A.D. (Ed). *Stress and Fish*. London: Academic Press p. 77-102.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transportation in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 283, 641-652.

- Fabbri, E., Capuzzo, A., Moon, T.W., 1998. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 120, 177-192.
- Flik, G., Verboost, P.M., 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. *Journal of Experimental Biology* 184, 17-29.
- Forsberg, J.A., Summerfelt, R.C., Barton, B.A., 2001. Physiological and behavioural stress responses of walleyes transported in salt and buffered-salt solutions. *North American Journal of Aquaculture* 63, 191-200.
- Gilmor, K.M., 1997. Gas exchange. In Evans, D.H. (Ed), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, New York, pp. 101-127.
- Gomes, L.C., Araújo-Lima, C.A.R.M., Roubach, R., Chiparri-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Urbinati, E.C., 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Aquaculture Society* 34, 76-84.
- Kubitza, F., 1997. Transporte de peixes vivos. Parte 1. *Panorama da Aqüicultura* 7, 20-26.
- Lin, H., Randall, D., 1995. Proton pumps in fish gills. In: Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds). *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. London: Academic Press p. 229-255.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. Journal Fish. Aquat. Sci.* 42, 630-648.
- Mazik, P.M., Simco, B.A., Parker, N. C., 1991. Influence of Water Hardness and Salts on Survival and Physiological characteristics of Striped Bass during and after Transport. *Transactions of American Fisheries Society* 120, 121-126.
- McDonald, D.G., Robinson, J.G., 1993. Physiological responses of lake trout to stress effects of water hardness and genotype. *Transactions of American Fisheries Society*. 122, 1146-1155.

- Mendonça, J.O.J., Senhorini, J.A., Fontes, N.A., Cantelmo, O.A., 1993. A influência da fonte protéica no crescimento do matrinxã, *Brycon cephalus*, em viveiros. Boletim Técnico do Cepta 6 (1),
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C.R., Trant, J.M., 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Progressive Fish-Culturist* 49(1), 1-12.
- Sanabria, A., 2002. Efeito da restrição alimentar no desempenho reprodutivo de machos de matrinxã *Brycon cephalus*. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP. Jaboticabal – SP. 60p.
- Sardet, C., 1980. Freeze fracture of the gill epithelium of euryhaline teleost fish. *Am. Journal Physiology* 238, 207-212.
- Staal, F.W., 2002. Animal form and function. In Campbell, N.A., Reece, J.B. (Eds), *Biology*. Pearson Higher Education, San Francisco, pp. 834-1057.
- Swann, L., 1992. Transport fish in bags. Technical report, Sea Grant Program, Purdue University, Illinois – Indiana. 4p.
- Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Parra, M.A.L., 2003. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture* (in press).
- Urbinati, E.C., Carneiro, P.C.F., 2001. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleostei: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. *Journal Aquaculture in the Tropics* 16(1), 75-85.
- Vasquez, L. H., 2003. Participação do hormônio triiodotironina (T₃) no desenvolvimento inicial do matrinxã (*Brycon cephalus*). Tese, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP. Jaboticabal – SP. 142p.

- Weil, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A., 2001. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture* 193, 373-380.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77(3), 591-625

CAPÍTULO II

USO DE SULFATO DE CÁLCIO COMO REDUTOR DE
ESTRESSE NO TRANSPORTE DE MATRINXÃS

Brycon cephalus

INTRODUÇÃO

O matrinxã, *Brycon cephalus*, é originário da Bacia Amazônica, com grande potencial para a aquicultura, pelo seu rápido crescimento, aceitação pelo consumidor e esportividade na pesca. O matrinxã tem presença obrigatória nos pesqueiros, no qual o mercado da piscicultura está muito ligado ao da pesca esportiva. No transporte de matrinxãs, são muito freqüentes problemas como estresse, falta de apetite e até mortalidade após a chegada.

O estresse está presente em todas as fases envolvidas no procedimento do transporte. No período de jejum os animais precisam disponibilizar energia extra-alimentar para manutenção. Na captura ocorre gasto excessivo de energia decorrente da perseguição e, logo após, os peixes são submetidos à exposição ao ar durante a contagem e transferência para as embalagens. Diversos autores relatam aumento da demanda fisiológica ao manejo durante a embalagem (Carmichael *et al.*, 1983; Forsberg *et al.*, 2001; Urbinati *et al.*, 2003). No transporte em sistema fechado, vários fatores como o acondicionamento em altas densidades, movimento irregular das embalagens e água do transporte com elevada concentração de amônia e outras toxinas resultantes do metabolismo, atuam como estressores.

Na tentativa de reduzir o estresse no transporte diversos produtos são adicionados à água, tais como o sal de cozinha (NaCl) (Carneiro & Urbinati, 2001; Gomes *et al.*, 2003), os anestésicos (Urbinati & Carneiro, 2001; Sandodden & Iversen, 2001; Pavlidis *et al.*, 2003), as soluções tamponantes (Amend *et al.*, 1982) e os sais de cálcio (Mazik *et al.*, 1991). O cálcio é essencial para os processos biológicos em peixes, e está ligado à osmorregulação principalmente no mecanismo de troca $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^{+}$ (Flik & Verbost, 1993). O cálcio reduz a permeabilidade da

membrana e junção celulares, reduzindo a perda de íons (McDonald & Robinson, 1993), provocada pela ação das catecolaminas (Wendelaar Bonga, 1997).

Para estudar as respostas de estresse em matrinxãs durante o transporte, foram testadas quatro concentrações de gesso agrícola (CaSO_4) na água, utilizando diferentes indicadores biológicos (hormonal, metabólicos, eletrolíticos e hematológicos).

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo experimental

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), Jaboticabal-SP. Cem matrinxãs ($200,21 \pm 51,12\text{g}$) foram estocados em 4 caixas de 500L com renovação de água e aeração, permanecendo em jejum durante 48 horas. Após este período foram acondicionados 12 peixes em cada saco plástico com capacidade para 60 L, (20L de água e 40L de oxigênio), e colocados dentro de caixas de polietileno para evitar perfurações. Utilizou-se 5 sacos para cada tratamento (réplicas), sendo 4 transportados e 1 deixado no laboratório para avaliar a condição pós-embalagem. Os tratamentos foram quatro concentrações de sulfato de cálcio (CaSO_4) dissolvido na água de transporte antes da colocação dos peixes: 0 (controle), 75, 150 e 300 mg L^{-1} . Enquanto o transporte era realizado os peixes remanescentes das caixas de 500L foram descartados e as caixas lavadas e enchidas com nova água.

Para o transporte, foi utilizada uma caminhonete na qual foi instalada uma lona sobre a carroceria para evitar a exposição dos peixes ao sol durante as 4 horas de viagem. Durante o transporte foi avaliada a temperatura do ambiente a cada 30 minutos. Na chegada os peixes retornaram para as caixas de 500L em que estavam antes do transporte (uma caixa por tratamento) para avaliação da recuperação.

Coletas e análises laboratoriais

Para determinar a condição inicial, 2 peixes de cada caixa foram amostrados ($n=8$), e outras quatro amostragens foram feitas: 15 minutos após embalagem (8 peixes/ saco/ tratamento, $n=8$) na chegada (2 peixes/ saco/ tratamento, $n=8$) e 24 e 96 horas após a chegada (8 peixes/ caixa/ tratamento).

Foram coletadas amostras de água no momento das amostragens biológicas para analisar o pH (peagâmetro YSI 63), oxigênio dissolvido e temperatura (oxímetro digital YSI 55), amônia não ionizada (reagente de Nessler), alcalinidade (Boyd, 1982), dureza (Boyd, 1982) e íons cálcio (Eletrodo seletivo de íons da Drake).

Para as amostragens os peixes foram rapidamente coletados e anestesiados em água com benzocaína (60mg L^{-1}). O sangue foi coletado em duas punções nos vasos caudais. A primeira foi feita com seringa sem anticoagulante, para as análises feitas no soro: cortisol (Radioimunoensaio Kit Coat-a-Count da Diagnostics Products Corporation); cloretos (Kit Labtest); sódio, potássio e cálcio (Eletrodo seletivo de íons da Drake). A segunda foi feita com seringa heparinizada para a dosagem de glicemia (King e Garner 1947), osmolalidade (osmômetro Wescor modelo 505) e hemoglobina, contagem de células vermelhas, volume corpuscular médio dos eritrócitos e hematócrito (Contador de células da Celm) e contagem de células brancas (câmara de Neubauer) no sangue total.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial $4 \times 4 +$ testemunha (nível inicial), tendo como fatores as concentrações de CaSO_4 e os tempos de coleta. Foram utilizadas 8 repetições e os dados submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5%. Os resultados apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média. Para os parâmetros da qualidade da água do transporte o delineamento foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos (concentrações de CaSO_4) e 4 repetições (embalagens de transporte), os dados submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias

comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5%. Os resultados apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média. A análise foi feita com auxílio do SAS Software (8.0).

RESULTADOS

Apenas um peixe transportado em 150 mg L^{-1} morreu no período de 24 horas de recuperação. A água utilizada para a depuração e recuperação dos peixes apresentou valores médios de pH $6,48 \pm 0,11$; alcalinidade e dureza $61,83 \pm 5,45$ e $46,5 \pm 6,03 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente; amônia total $0,097 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$ e temperatura $23,6 \pm 1,4^\circ\text{C}$. Durante o transporte a temperatura do ambiente foi $29,2 \pm 1,0$ e na chegada, a da água era de $27,7 \pm 0,8^\circ\text{C}$. O pH da água foi menor nas embalagens sem adição de CaSO_4 (Fig. 1). A dureza aumentou conforme a concentração de CaSO_4 , e a alcalinidade não foi diferente (Fig. 2). A concentração de amônia total foi maior na água com 150 e 300 mg L^{-1} CaSO_4 e a concentração de cálcio aumentou com o aumento do CaSO_4 (Fig. 3 e 4).

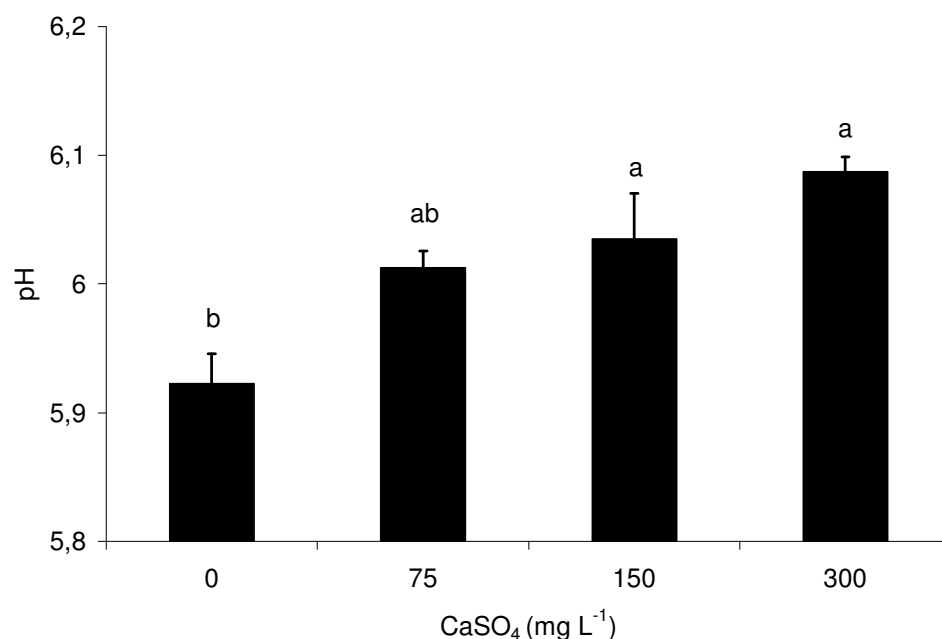


Figura 1. Valores médios do pH da água após transporte de matrinxãs por 4 horas em diferentes concentrações de CaSO_4 . Médias com mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=4$).

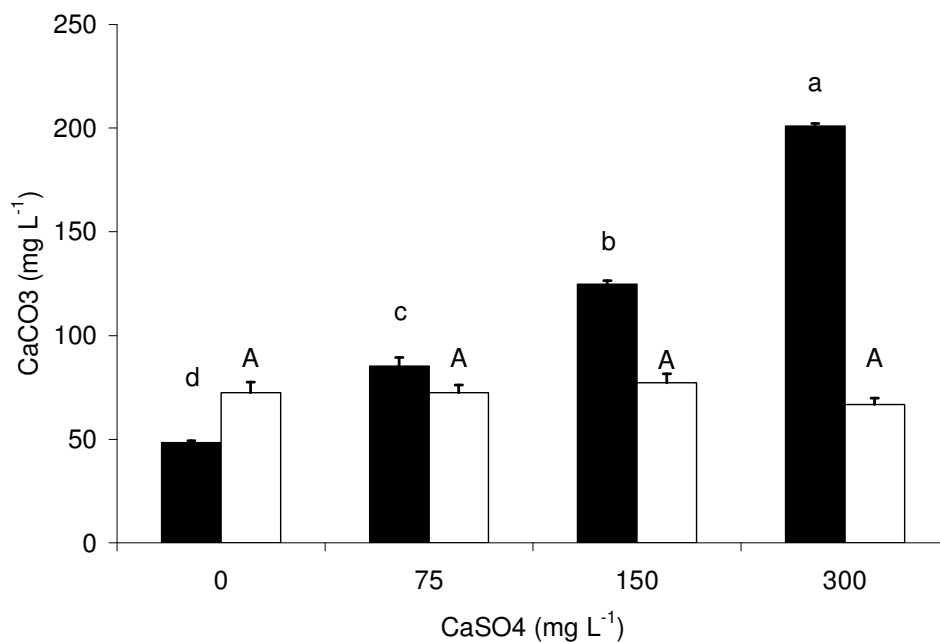


Figura 2. Valores médios da dureza (v) e alcalinidade () da água após transporte de matrinxãs por 4 horas em diferentes concentrações de CaSO₄. Médias com mesma letra (minúsculas para dureza e maiúsculas para alcalinidade) não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=4$).

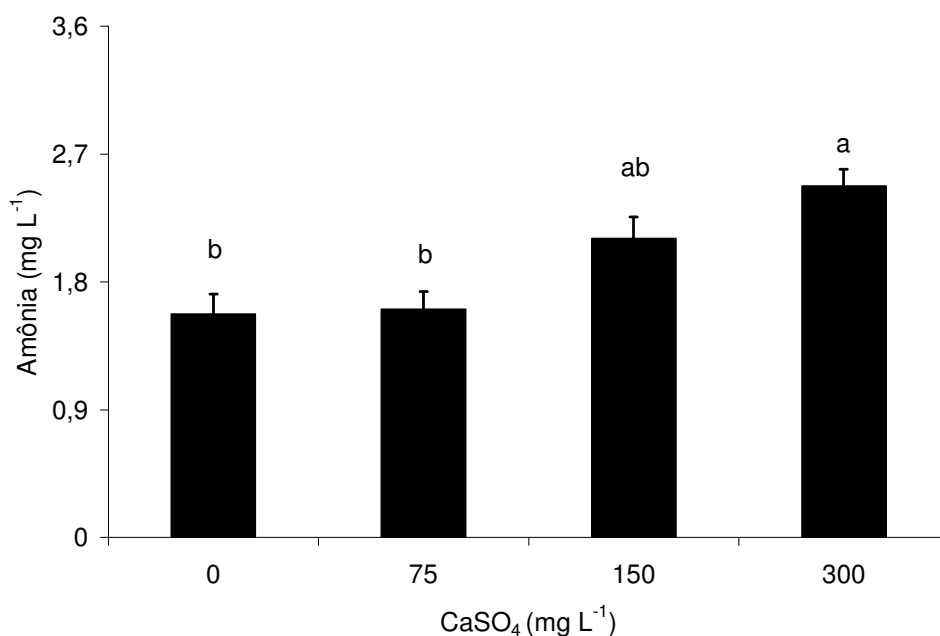


Figura 3. Valores médios da concentração de amônia total na água, após transporte de matrinxãs por 4 horas em diferentes concentrações de CaSO₄. Médias com mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=4$).

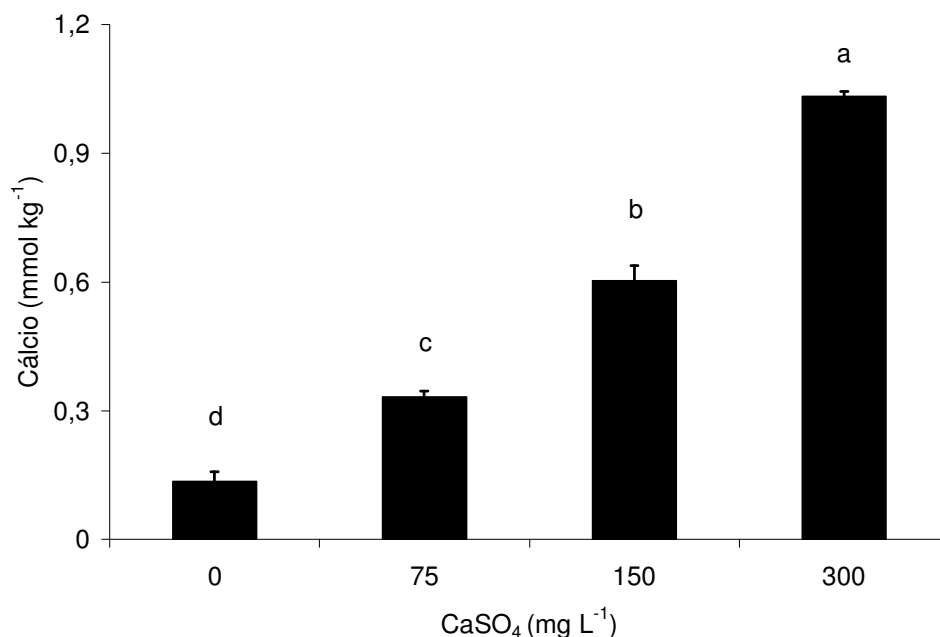


Figura 4. Valores médios de íons cálcio dissolvidos na água, após transporte de matrinxãs por 4 horas em diferentes concentrações de CaSO₄. Médias com mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=4$).

Os níveis de cortisol circulante aumentaram após embalagem, nos peixes transferidos para a água com adição de CaSO₄. Após o transporte, esse perfil se inverteu, apresentando o menor valor nos peixes transportados com 300 mg L⁻¹ ($p=0,10$) comparado aos peixes transportados sem adição de CaSO₄ (controle). Os peixes transportados com 150 mg L⁻¹ recuperaram os valores iniciais em 24 horas, sendo que nos outros tratamentos os níveis de cortisol não foram diferentes dos peixes controle transportados sem CaSO₄. Às 96 horas de recuperação, os valores de cortisol se igualaram estatisticamente aos dos peixes controle, com exceção do grupo transportado em água contendo 75 mg L⁻¹ de CaSO₄ (Fig.5).

Os valores de glicemia não diferiram significativamente entre os tratamentos, apenas entre os tempos de coleta analisados, apresentando aumento na chegada e queda a níveis mais baixos que os iniciais 24 e 96 horas depois (Fig. 6).

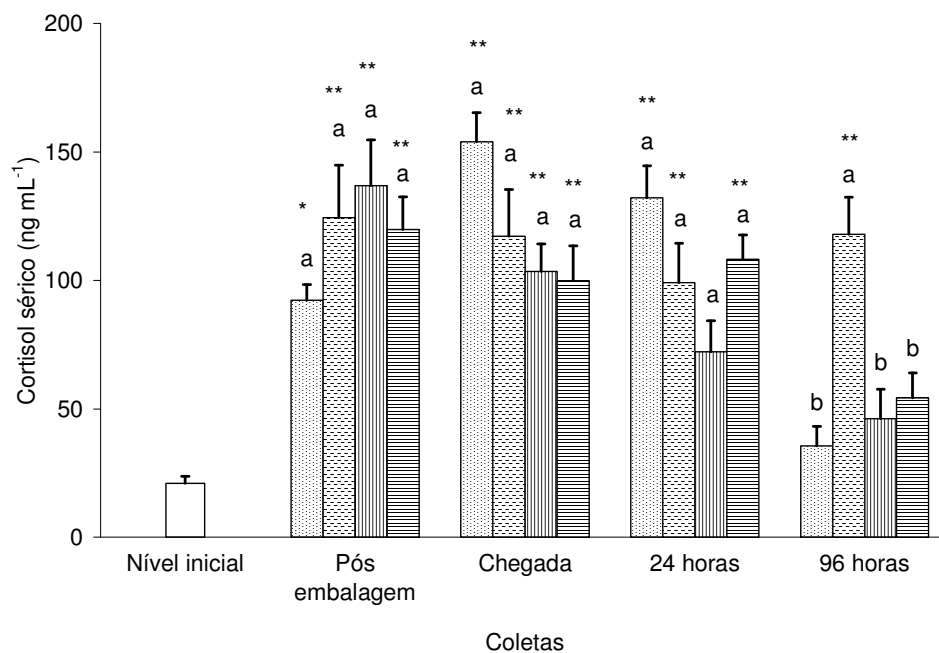


Figura 5. Valores médios de cortisol sérico em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (litrado vertical) e 300 mg L^{-1} (litrado horizontal). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo de coleta. Asteriscos simples e duplos indicam diferenças ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) entre cada tratamento e o nível inicial (barra aberta). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

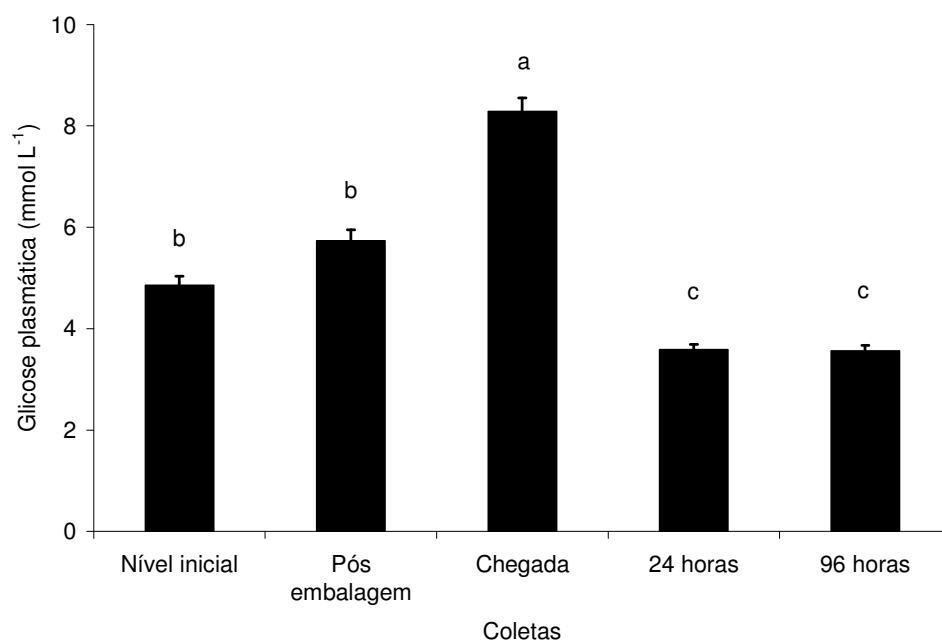


Figura 6. Valores médios de todos os tratamentos de glicemia plasmática, que não diferiram entre si, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs transportados por 4 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$ nível inicial; $n=32$ demais coletas).

Os níveis de cloreto sérico diminuíram no momento da chegada exceto nos peixes transportados com 300 mg L^{-1} ($p=0,04$) embora estatisticamente somente os peixes do grupo controle apresentaram diferença em relação à testemunha (Fig. 7).

A concentração sérica de sódio após a embalagem diminuiu em todos os tratamentos de CaSO_4 quando comparados aos valores iniciais e em todos os tratamentos, na chegada, retornando ao nível inicial em 24 horas (Fig. 8).

Os valores de potássio sérico apresentaram uma tendência de diminuição inversamente relacionada à concentração de sulfato cálcio após a embalagem. Na chegada, os níveis deste íon apresentaram-se maiores que o nível inicial nos peixes dos tratamentos 75 e 300 mg L^{-1} retornando ao nível inicial em 24 horas (Fig. 9).

As médias de cálcio sérico não diferiram significativamente entre os tratamentos. As médias gerais apresentaram uma diminuição no momento pós-embalagem e na chegada do transporte, recuperação em 24 horas e aumento depois de 96 horas de transporte (Fig.10).

A osmolalidade plasmática apresentou diferença significativa após o transporte para todos os tratamentos com CaSO_4 em relação ao controle e à testemunha. Todos os tratamentos, inclusive o controle, tiveram valores mais altos às 24 horas os quais se mantiveram até as 96 horas de recuperação (Fig.11).

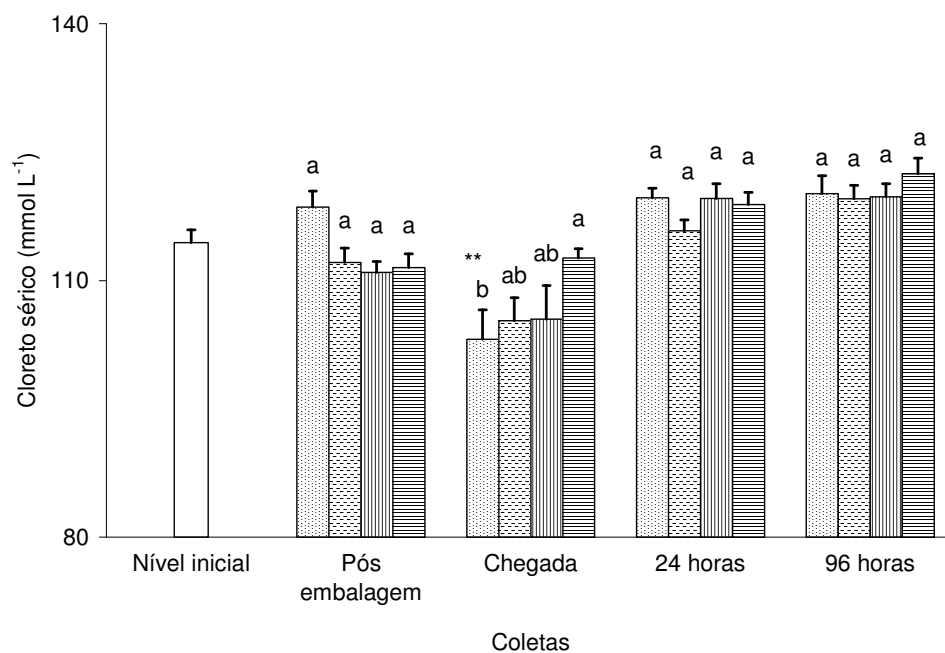


Fig. 7. Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (litrado vertical) e 300 mg L^{-1} (litrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

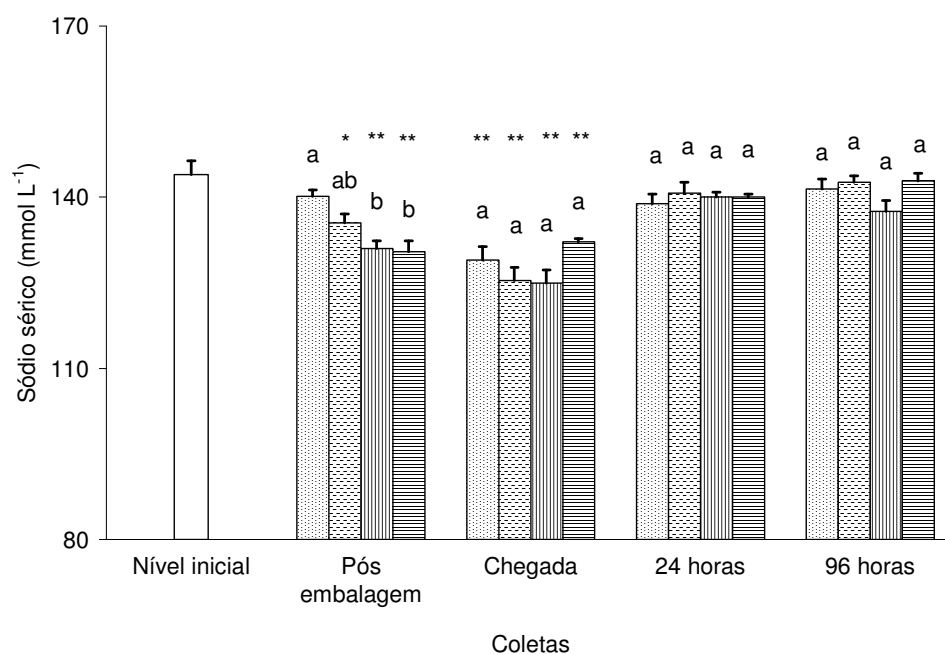


Fig. 8. Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (litrado vertical) e 300 mg L^{-1} (litrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

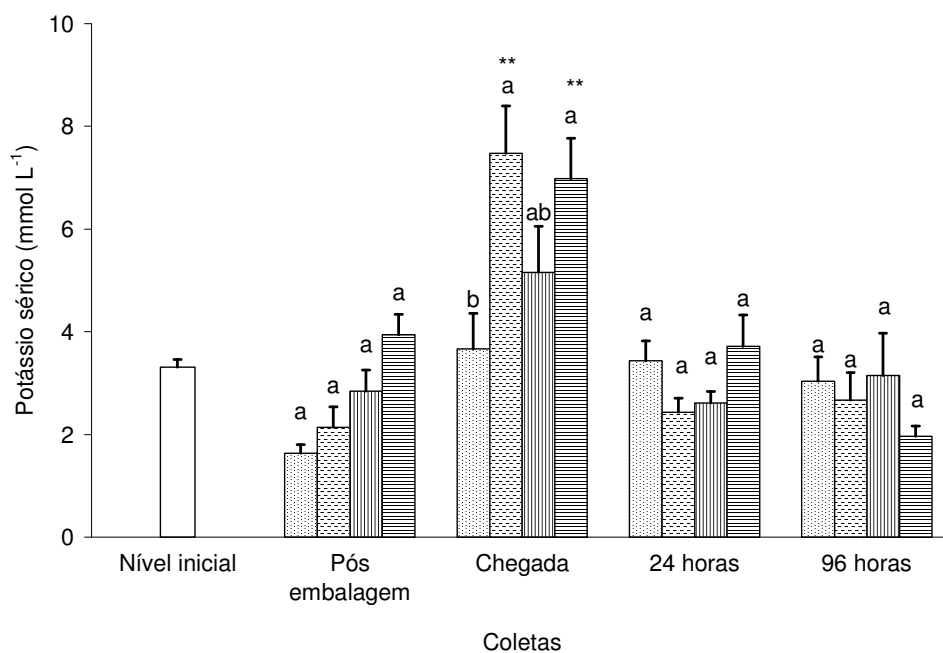


Figura 9. Valores médios de potássio sérico em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (litrado vertical) e 300 mg L^{-1} (litrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

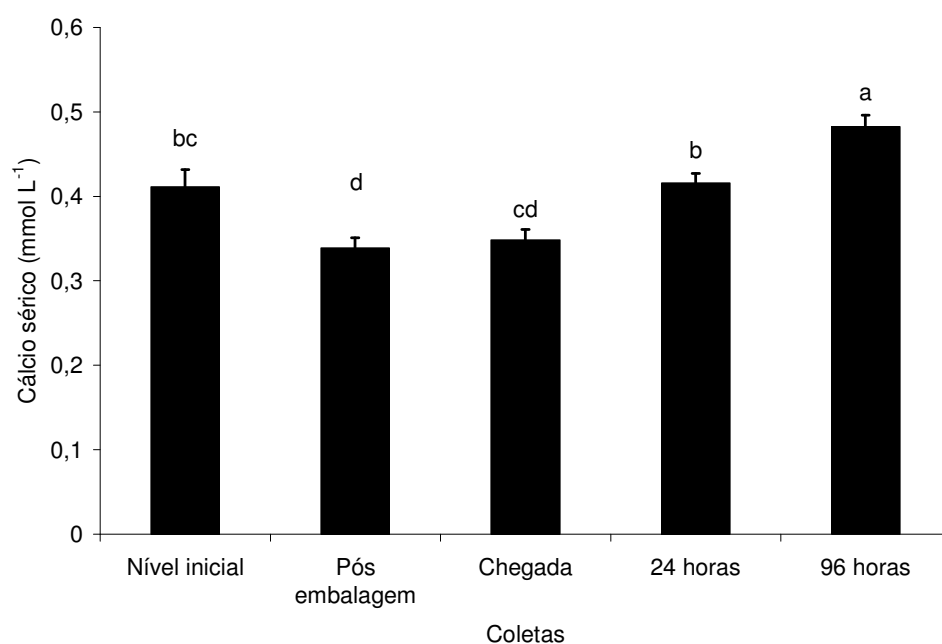


Figura 10. Valores médios de todos os tratamentos de cálcio sérico, que não diferiram entre si, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs transportados por 4 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$ nível inicial; $n=32$ demais coletas).

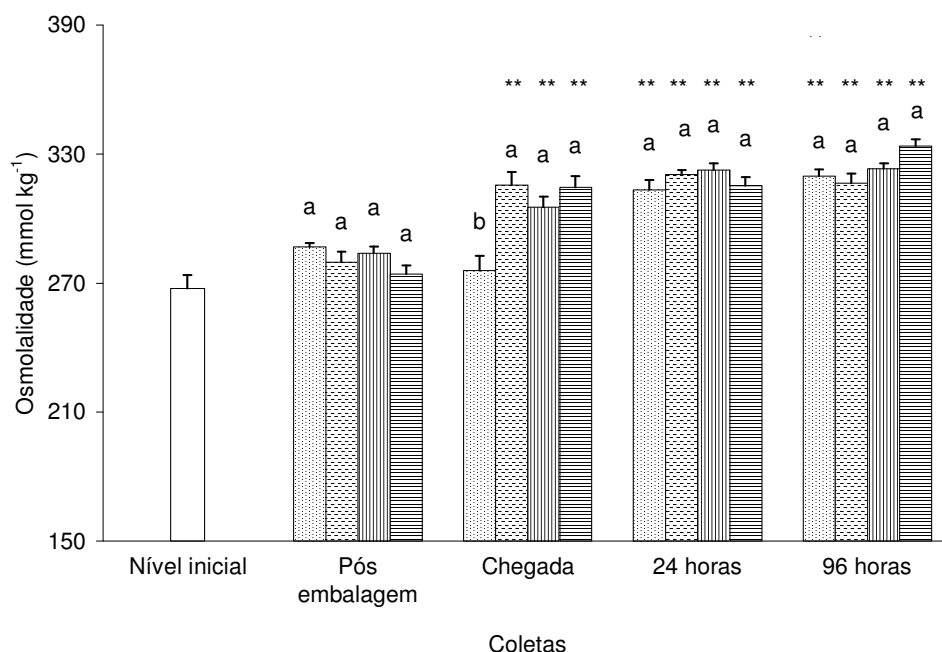


Figura 11. Valores médios da osmolalidade plasmática em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (litrado vertical) e 300 mg L^{-1} (litrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

O hematócrito foi maior nos peixes de todos os tratamentos após a embalagem e na chegada, com exceção dos peixes transportados na maior concentração de CaSO_4 . Após 24 horas os valores se mantiveram elevados nos peixes de todos os tratamentos, sendo que nos de 300 e 150 mg L^{-1} houve retorno ao nível inicial 96 horas após a chegada (Fig. 12).

O número de eritrócitos aumentou significativamente nos grupos controle ($p < 0,05$) e 75 mg L^{-1} de CaSO_4 ($p < 0,01$) após a embalagem. Na chegada os peixes do grupo controle e 150 mg L^{-1} apresentaram valores maiores que o nível inicial. Após 96 horas apenas os peixes do tratamento com 300 mg L^{-1} voltaram ao nível inicial (Fig. 13).

O volume corpuscular médio das células sanguíneas vermelhas foi maior que o valor inicial após a embalagem nos tratamentos 75, 150 e 300 mg L^{-1} e na chegada do transporte apenas no tratamento 75 mg L^{-1} . Após 24 horas, os peixes

dos tratamentos 150 e 300 mg L⁻¹ apresentaram-se maiores do que o nível inicial e 96 horas depois da chegada os peixes de todos os tratamentos voltaram à condição inicial (Fig. 14).

A taxa de hemoglobina não foi diferente entre os tratamentos, apresentando aumento após a embalagem e transporte, mantendo-se elevada até 96 horas (Fig. 15).

O número de leucócitos aumentou significativamente após 24 horas da chegada para os tratamentos 75, 150 e 300 mg L⁻¹. Depois de 96 horas esses valores voltaram ao nível inicial nos peixes de todos (Fig. 16).

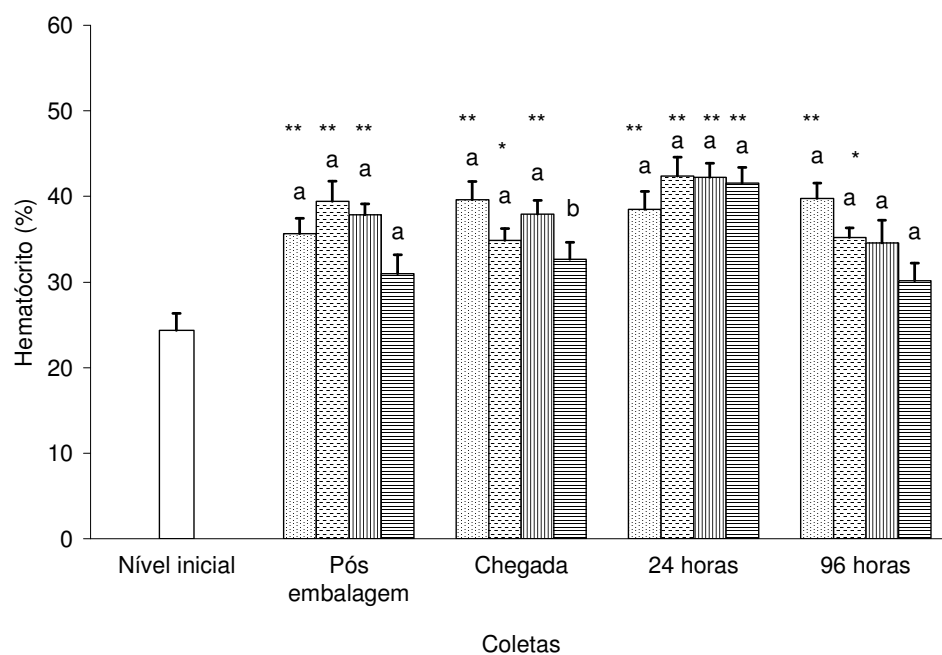


Figura 12. Valores médios do hematócrito (%) em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO₄ em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (listrado vertical) e 300 mg L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

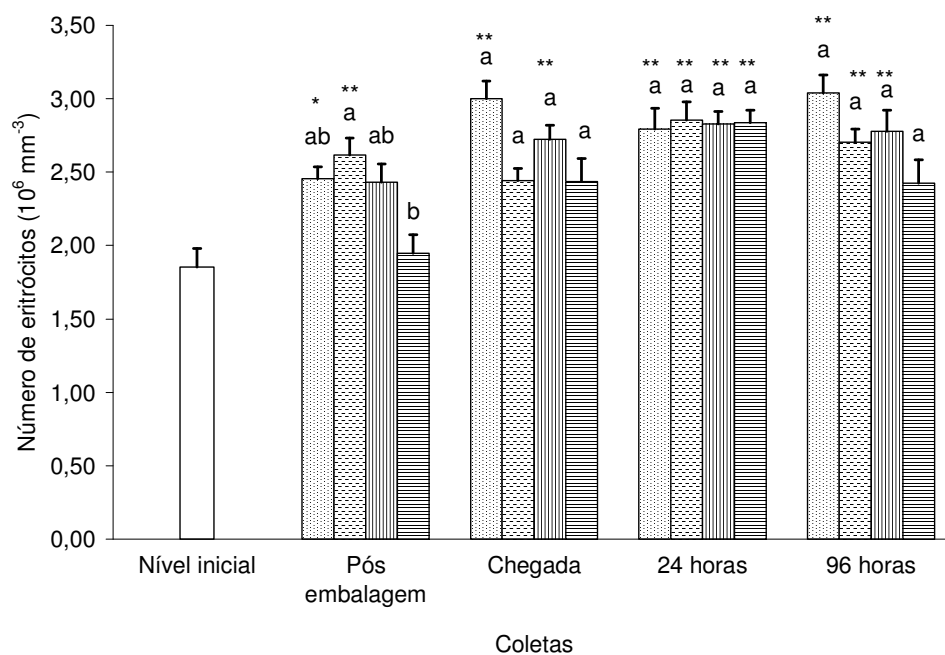


Figura 13. Valores médios do número de eritrócitos em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (listrado vertical) e 300 mg L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

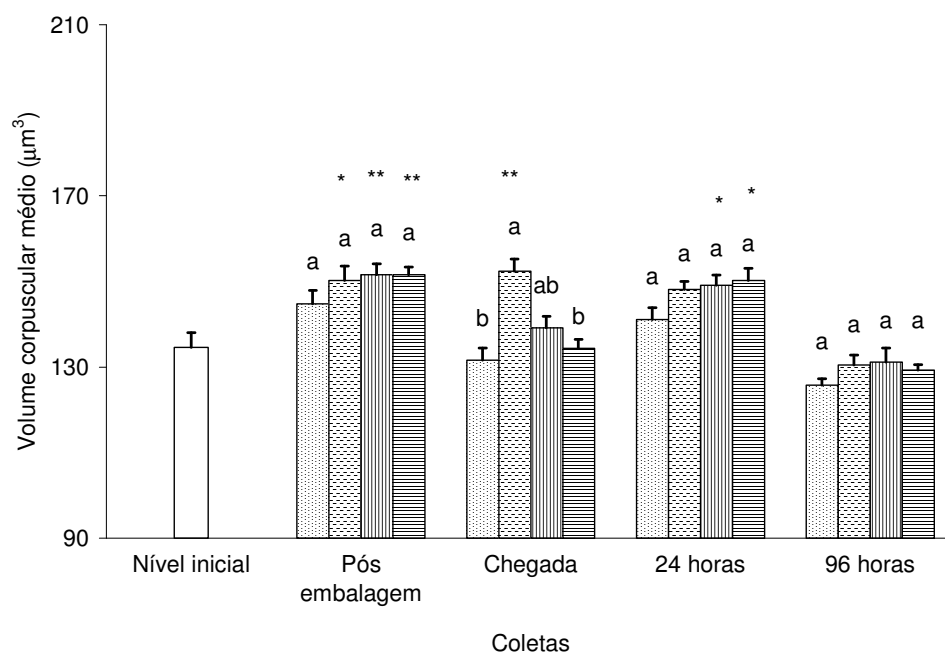


Figura 14. Valores médios do volume corpuscular médio dos eritrócitos em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (listrado vertical) e 300 mg L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

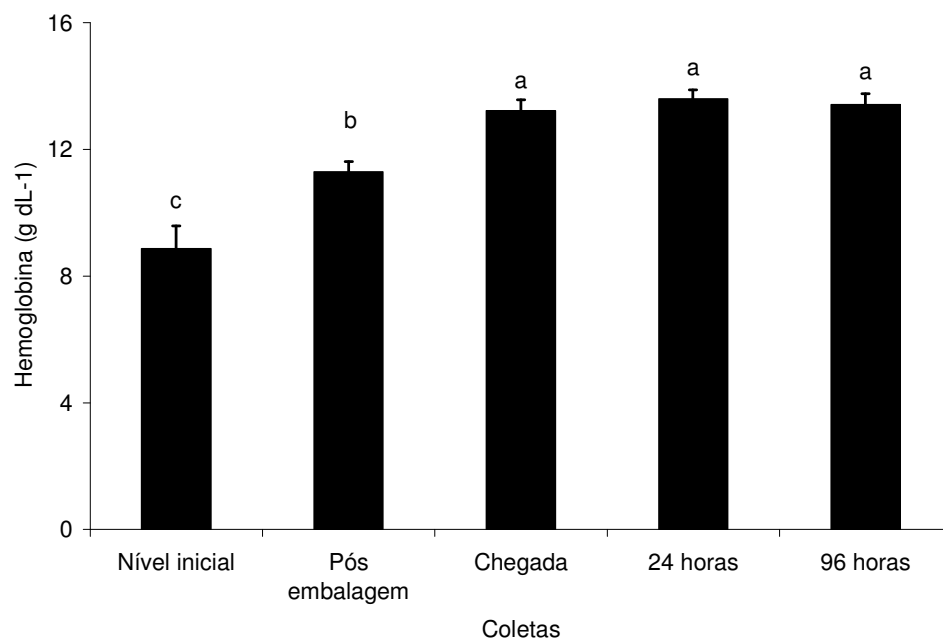


Figura 15. Valores médios de todos os tratamentos de hemoglobina, que não diferiram entre si, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs transportados por 4 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$ nível inicial; $n=32$ demais coletas).

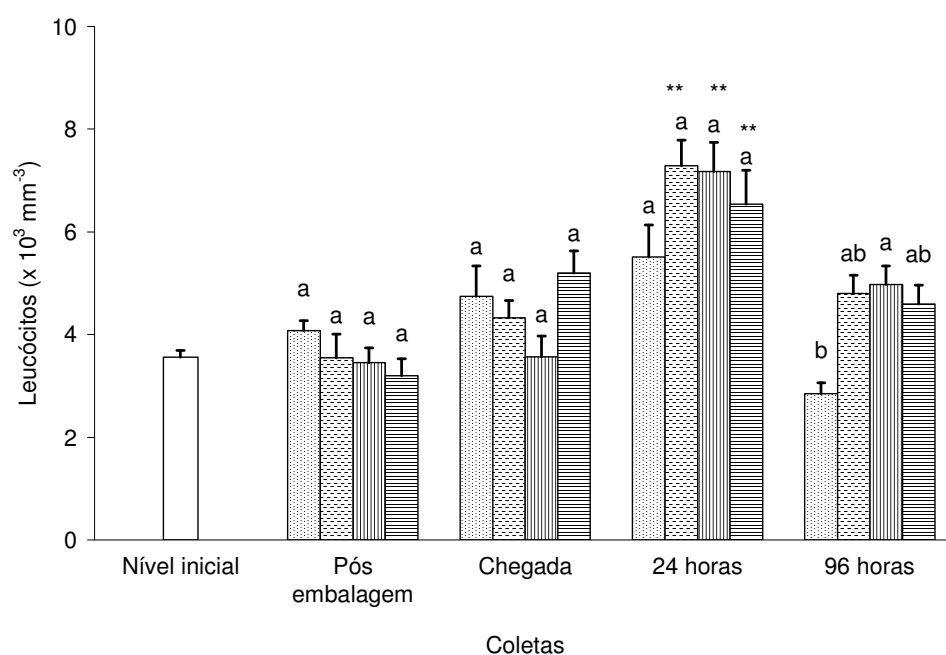


Figura 16. Valores médios do número de leucócitos em matrinxãs transportados por 4 horas em água com adição de CaSO_4 em concentrações de 0 (pontilhado); 75 (tracejado); 150 (litrado vertical) e 300 mg L⁻¹ (litrado horizontal). Ver Figura 5 para informações sobre letras e asteriscos.

DISCUSSÃO

A qualidade da água no transporte de peixes vivos é um dos fatores que influenciam o seu estado fisiológico. A adição de sais de cálcio na água confirmou o aumento em sua dureza e a concentração de íons cálcio. A água das embalagens com maiores concentrações de CaSO_4 tinham concentrações maiores de amônia após o transporte. O mesmo foi observado por Iwama *et al.* (1997) quando trutas excretaram menores quantidades de amônia em água mole e pH elevado, entretanto as que foram transferidas para água com adição de sais de cálcio e magnésio excretaram mais e possuíam menores níveis circulantes deste metabólito. A variação do pH da água, em sistemas de transporte fechado, está ligada a excreção de CO_2 pelos peixes e a capacidade de neutralizar ácidos da água (alcalinidade). No presente estudo, a alcalinidade da água do transporte não foi afetada pelos tratamentos, porém o pH diminuiu significativamente na água dos peixes transportados sem adição de CaSO_4 , sugerindo maior excreção de CO_2 neste grupo. Respostas a concentrações elevadas de CO_2 na água indicaram distúrbios hematológicos e eletrolíticos em barramundi, *Lates calcarifer* (Paterson *et al.* 2003). A temperatura da água na condição inicial e durante o período de recuperação se manteve com pouca variação devido ao fluxo que foi contínuo e proveniente de poço. Durante o transporte, a temperatura do ambiente foi elevada, propiciando maior temperatura na chegada.

O cortisol é um componente essencial da resposta de estresse e na regulação osmótica em peixes (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.* 1999). Os níveis iniciais de cortisol (menores de 30 ng mL^{-1}) apresentaram valores próximos aos descritos para matrinxã não estressado (Rosato, 2003). Após a embalagem, os níveis circulantes deste hormônio aumentaram em 4 vezes nos

peixes do grupo controle e 6 vezes nos grupos tratados, semelhantemente ao observado por Brown *et al.* (2001) durante a transferência abrupta de *Stizostedion lucioperca* de meio hipoosmótico para meio hiperosmótico. Mancera *et al.* (2002) também mostraram a importância do cortisol na regulação iônica de *Sparus aurata* transferidos para meios hipoosmóticos. Na chegada, os peixes transportados com CaSO_4 (300 mg L^{-1}) apresentaram níveis mais baixos de cortisol e 24 horas depois estes níveis já estavam semelhantes aos iniciais no tratamento com 150 mg L^{-1} , resultado semelhante ao encontrados por Carneiro & Urbinati (2001), onde matrinxãs transportados com adição de NaCl em concentração próxima à plasmática, tiveram melhores respostas homeostáticas após transporte. Segundo Forsberg *et al.* (2001), a adição de NaCl (5000 mg L^{-1}) ou NaCl + NaHCO_3 ($4500 + 500 \text{ mg L}^{-1}$) não foi eficiente na diminuição do cortisol de *Stizostedion vitreum* transportado durante 2 horas. Do mesmo modo, a utilização de CaCl_2 (100 mg L^{-1}) não foi eficaz para mitigar a elevação dos níveis plasmáticos deste hormônio após transporte de *Morone saxatilis* por 5 horas (Mazik *et al.*, 1991).

A elevação dos níveis glicêmicos indica a necessidade de energia para suportar situações adversas. Este aumento, nos casos de estresse, tem origem glicogenolítica proveniente da ação das catecolaminas e corticosteróides (Mommsen *et al.* 1999), sendo excelente indicador de estresse em peixes (Wendelaar Bonga 1997). Neste trabalho, não houve diferenças para este parâmetro entre os tratamentos. Porém os peixes de todos os tratamentos apresentaram hiperglicemia após a chegada. A diminuição a níveis menores que os iniciais após 24 e 96 horas pode ser explicada pela falta de alimentação dos animais até este momento.

Diversos trabalhos têm demonstrado que as concentrações plasmáticas de sódio e cloreto, em peixes de água doce, diminuem após manejos estressantes

(Carmichael 1983; Iversen, 1998; Carneiro e Urbinati, 2001; Forsberg, 2001), sendo necessárias 24 horas para o restabelecimento dos valores basais (Carneiro e Urbinati, 2001; Urbinati *et al.*, 2003). A perda de íons (principalmente sódio) e a tendência a ganhar água são os distúrbios eletrolíticos que devem ser reduzidos em peixes transportados em água doce (Carneiro & Urbinati 2001). O cálcio na água, através de reação com grupos aniônicos, pode alterar a hidratação das estruturas branquiais e assim reduzir a sua permeabilidade para íons sódio e cloreto (Potts, 1984). Neste trabalho as concentrações de sódio diminuíram conforme aumentavam as concentrações de CaSO_4 nos tratamentos e as de cloreto se mantiveram após a embalagem. Entretanto, na chegada, o perfil inverteu-se apontando melhor desempenho fisiológico de regulação dos níveis de cloreto nos animais transportados na concentração mais alta de CaSO_4 . O sódio sérico foi baixo em todos os tratamentos após o transporte embora um valor mais alto possa ser verificado nos peixes transportados em 300 mg L^{-1} . Diminuições nos níveis de sódio também foram observadas em “striped bass” transportados em 100 mg L^{-1} de CaCl_2 e 110 mg L^{-1} de dureza, do mesmo modo que nos peixes controle, transportados sem adição de CaCl_2 e 28 mg L^{-1} de dureza (Mazik *et al.*, 1991).

Os níveis de potássio circulante podem não oscilar com o estresse (Carmichael *et al.*, 1983; Morgan & Iwama, 1996; Carneiro & Urbinati, 2001), porém o aumento deste cátion pode estar correlacionado à fragilidade da membrana dos eritrócitos e ocorrência de hemólise na amostragem, suficiente para elevar os níveis encontrados em alguns tratamentos (Hattingh & Van Pletzen, 1974).

Apesar de haver influência da concentração de cálcio da água nos níveis de cálcio no sangue (Flik & Verbost, 1993), não houve variação sérica deste íon nos peixes dos diferentes tratamentos. Os teleósteos regulam a captação de cálcio por

meio de um órgão chamado de corpúsculo de Stannius, produtor de um hormônio (estaniocalcina), que possui função de reduzir a captação deste íon em meio com altas concentrações (Flik *et al.* 1995). Além da prolactina e somatolactina (Kaneko & Hirano, 1993) o cortisol também influencia na regulação da captação deste íon, promovendo ação hipercalcêmica (Flik & Verbost, 1993). Neste trabalho, houve um perfil semelhante ao descrito, onde após a embalagem e o transporte, o excesso de cálcio na água promoveu diminuição na absorção. Durante a recuperação, as baixas concentrações na água e o efeito do cortisol estimularam a captação deste íon em quantidades crescentes até 4 dias após o transporte.

Robertson *et al.* (1987) não encontraram variações na osmolalidade plasmática após o transporte. Por outro lado, Weirich *et al.*, (1992), observaram diminuição da osmolalidade e incapacidade de inibir esta disfunção pela adição de cálcio na água do transporte. Neste trabalho, ocorreu aumento na concentração de íons 24 horas após a chegada para todos os tratamentos, inclusive o controle, em relação à testemunha, demonstrando uma tendência à recuperação dos íons perdidos durante o estresse do transporte, superando os níveis observados inicialmente.

As variáveis hematológicas são indicadoras de distúrbios físicos e processos fisiológicos em peixes (Fabbri *et al.*, 1998). Injeção de cortisol aumentou o consumo de oxigênio em trutas (Morgan & Iwama, 1996) e em carpas elevou o volume e número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina (Wojtaszek *et al.*, 2002). O aumento do volume das células é causado pelo estímulo à troca Na^+/H^+ e a inibição da $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, pela membrana dos eritrócitos para elevar o pH interno, aumentando a afinidade da hemoglobina com oxigênio (efeito Root), ao mesmo tempo aumenta o gradiente osmótico entre o plasma e o citoplasma, carreando água para dentro das

células (Gilmour, 1997). Após a embalagem os peixes necessitaram maior quantidade de oxigênio em consequência dos procedimentos de captura, que envolve fuga, exposição ao ar e adaptação ao novo ambiente, principalmente para os peixes embalados com CaSO_4 . Outra estratégia adicional no transporte de oxigênio em resposta ao estresse é o recrutamento de eritrócitos pela contração do baço (Gilmour, 1997). Esta alteração não foi registrada pelos peixes do tratamento 300 mg L^{-1} após a embalagem e na chegada, que também tiveram os menores níveis circulantes de cortisol após o transporte. A utilização do hematócrito como indicador fisiológico de estresse fica limitado frente a duas possibilidades de interpretação, volume e número de células, entretanto pode ser observado um maior efeito no número de eritrócitos que no volume destas células. Elevação do hematócrito após a embalagem de transporte também foi observado para a mesma espécie por Urbinati *et al.* (2003).

Com o aumento no número de células a taxa de hemoglobina também foi elevada, semelhante a outros trabalhos (Wojtaszek *et al.*, 2002; Benfey & Biron, 2000), porém sem diferenças entre os tratamentos.

Um estudo hematológico mostrou variações alternadas de leucopenia e leucocitose após a aplicação de estresse em peixes (Pickford *et al.*, 1971). Após 24 horas de injeção de cortisol carpas apresentaram leucocitose (Wojtaszek *et al.*, 2002), semelhantemente ao encontrado neste estudo. A leucopenia foi constatada após 30 minutos de aplicação do estressor por Benfey & Biron (2000) e Pickford *et al.* (1971) fizeram a mesma observação após 3 e 30 minutos, fato não observado em nenhum momento neste experimento.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram o quanto é estressante o manejo pré transporte e o próprio transporte, assim como a recuperação é lenta e

não total segundo alguns indicadores. O gesso nas concentrações testadas teve influência moderada na diminuição das respostas aos estímulos, mas concentrações mais altas devem ser testadas, além da aplicação de período de adaptação ao CaSO_4 previamente ao invés da transferência rápida de ambiente. Os resultados mostram bons indicativos do uso do CaSO_4 que apresentou a propriedade de aumentar a excreção de amônia. Este aspecto deve ser testado para se avaliar a viabilidade da utilização deste produto no manejo de depuração dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amend, D.F., Croy, T.R., Goven, B.A., Johnson, K.A., McCarthy, D.H., 1982. Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon dioxide, pH, and bacterial growth. *Transactions of American Fisheries Society* 111, 603-611.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Reviews of Fish Disease* 1, 3-26.
- Benfey, T., Biron, M., 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 184, 167-176.
- Boyd, C.E., 1982. Water quality management for pond fish culture. Elsevier, Amsterdam, p. 317.
- Brown, J.A., Moore, W.M., Quabius, E.S., 2001. Physiological effects of saline waters on zander. *Journal Fish Biology* 59, 1544-1555.
- Carmichael, G.J., Wedemeyer, A., McCraren, J.P., Millard, J.L., 1983. Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Progressive Fish-Culturist* 45(2), 110-113.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research* 32, 297-304.
- Fabbri, E., Capuzzo, A., Moon, T.W., 1998. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 120, 177-192.
- Flik, G., Verbost, P.M., 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. *Journal of Experimental Biology* 184, 17-29.
- Flik, G., Verbost, P.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1995. Calcium transport process in fish. In Wood, C.M., Shuttleworth, T. J. (Eds), *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. Academic Press, London, pp. 317-342.

- Forsberg, J.A., Summerfelt, R.C., Barton, B.A., 2001. Physiological and behavioural stress responses of walleyes transported in salt and buffered-salt solutions. *North American Journal of Aquaculture* 63, 191-200.
- Gilmor, K.M., 1997. Gas exchange. In Evans, D.H. (Ed), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, New York, pp. 101-127.
- Gomes, L.C., Araújo-Lima, C.A.R.M., Roubach, R., Chiparri-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Urbinati, E.C., 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Aquaculture Society* 34, 76-84.
- Hattingh, J., Van Pletzen, A.J.J., 1974. The influence of capture and transportation on some blood parameters of fresh water fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 49A, 607-609.
- Iversen, M., Finstad, B., Nissen, K.J., 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 168, 387-394.
- Iwama, G.K., McGeer, J.C., Wright, P.A., Wilkie, M.P., Wood, C.M., 1997. Divalent cations enhance ammonia excretion in Lahontan cutthroat trout in highly alkaline water. *Journal of fish Biology* 50, 1061-1073.
- Kaneko, T., Hirano, T., 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *Journal Experimental of Biology* 184, 31-45.
- King, E. J., Garner, R.J., 1947. Colorimetric determination of glucose. *J. Clin. Pathol.* 1, 30-33.
- Mancera, J.M., Carrión, R.L., Martín del Río, M.P., 2002. Osmoregulatory actino of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology* 129, 95-103
- Mazik, P.M., Simco, B.A., Parker, N. C., 1991. Influence of Water Hardness and Salts on Survival and Physiological characteristics of Striped Bass during and after Transport. *Transactions of American Ficheries Society* 120, 121-126.

- McDonald, D.G., Robinson, J.G., 1993. Physiological responses of lake trout to stress effects of water hardness and genotype. *Trans. Am. Fish. Soc.* 122, 1146-1155.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
- Morgan, J.D., Iwama, G.K., 1996. Cortisol induces changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiology and Biochemistry* 15 (5), 385-394.
- Paterson, B.D., Rimmer, M.A., Meikle, G.M., Semmens, G.L., 2003. Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidoses, red cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture* 218, 717-728.
- Pavlidis, M., Angellotti, L., Papandroulakis, N., Divanach, P., 2003. Evaluation of transportation procedures on water quality and fry performance in red porgy (*Pagrus pagrus*) fry. *Aquaculture* 218, 187-202.
- Pickford, G.E., Srivastava, A.K., Slicher, A.M., Pang, P.K.T., 1971. The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Journal Experimental Zoology* 177, 89-96.
- Potts, W.T.W., 1984. Transepithelial Potentials in Fish Gills. In Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds). *Fish Physiology, Volume X, Gills, Part B*. Academic Press, London, pp. 105-128.
- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C.R., Trant, J.M., 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Progressive Fish-Culturist* 49(1), 1-12.
- Rosato, P.N., Gonçalves, F.D., Urbinati, E.C., 2003. Cortisol and blood profile as stress indicators on matrinxã (*Brycon cephalus*) submitted to air exposure. In: *World Aquaculture 2003, Book of abstracts*. Salvador, pp 651.

- Sandodden, R., Iversen, M., 2001. Transport stress in atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia e recovery. *Aquaculture Research* 32, 87-90.
- Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Parra, M.A.L., 2003. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture* (in press).
- Urbinati, E.C., Carneiro, P.C.F., 2001. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleostei: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. *Journal Aquaculture in the Tropics* 16(1), 75-85.
- Weirich, C.R., Tomasso, J.R., 1992. Confinement and transport-induced stress in white bass *Morone chrysops* x striped bass *M. saxatilis* hybrids: Effect of calcium and salinity. *Journal of the World Aquaculture Society* 23, 49-57
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77(3), 591-625
- Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-Gabska, M., Adamowicz, A., Dzugaj, A., 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Ciprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology* 125, 176-183.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

Atualmente o transporte de peixes é realizado com a adição de diversos produtos na água, sendo alguns para minimizar o estresse, outros para a prevenção de parasitas. Porém, as doses que são utilizadas e até mesmo muitos dos produtos nunca foram testados em espécies nativas do Brasil. Algumas espécies são sensíveis até ao sal (NaCl), o produto mais freqüentemente utilizado no transporte.

O gesso agrícola vem sendo utilizado por poucos produtores para a diminuição do estresse. Entretanto neste trabalho notou-se que a adição deste produto em doses de até 300 mg L⁻¹ não prejudicou os animais e, pelo contrário, melhorou o desempenho fisiológico segundo alguns indicadores analisados após o transporte. É provável que os resultados fossem mais evidentes se os peixes não fossem transferidos rapidamente para a nova concentração de cálcio na água, causando um choque osmótico na transferência, fato corroborado pelas respostas do matrinxã nas maiores concentrações de CaSO₄ após a embalagem.

Outros estudos devem ser realizados testando a utilização do gesso como estimulador da excreção da amônia antes do transporte, por exemplo, no período de jejum. Deste modo haveria diminuição da excreção deste metabólito, prejudicial ao bem estar dos peixes durante o transporte. Esse procedimento permitiria inclusive a aclimação dos peixes à nova dureza da água. Com a diminuição da excreção da amônia durante o transporte, a duração da viagem poderia ser maior e o volume transportado aumentado e, desta forma diminuindo os custos com esta etapa da cadeia produtiva.