UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RICARDO HENRIQUE FRANCO DE OLIVEIRA

Potencial mitigador do óleo de cravo sobre as respostas fisiológicas ao estresse de exposição aérea e de transporte no lambari, *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000).

Pirassununga

2016

RICARDO HENRIQUE FRANCO DE OLIVEIRA

Potencial mitigador do óleo de cravo sobre as respostas fisiológicas ao estresse de exposição aérea e de transporte no lambari, *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000).

“Versão Corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Maria Macedo Viegas.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elyara Maria Pereira-da-Silva.

Pirassununga

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

048p

Oliveira, Ricardo Henrique Franco de
Potencial mitigador do óleo de cravo sobre as
respostas fisiológicas ao estresse de exposição aérea
e de transporte no lambari, *Astyanax altiparanae* (
/ Ricardo Henrique Franco de Oliveira ;
orientadora Profa. Dra. Elisabete Maria Macedo
Viegas ; coorientadora Elyara Maria Pereira-da-Silva
-- Pirassununga, 2016.
95 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Anestesia. 2. Eugenol. 3. Exposição Aérea. 4.
Peixes. 5. Transporte . I. Viegas, Profa. Dra.
Elisabete Maria Macedo , orient. II. Pereira-da-Silva
, Elyara Maria, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Agradecimento especial a Deus, a minha amada esposa Rute e meus
Filhos Samuel e Mateus.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais (Leila e José Luiz) pela instrução e meus irmãos (Octavio e Neto) pelo incentivo.

A Profa. Dra. Elisabete M. M. Viegas pela orientação, confiança e auxílio neste trabalho.

Em especial agradecimento à minha irmã mais velha e Co-orientadora Profa. Dra. Elyara Maria Pereira-da-Silva, pelo apoio, auxílio, conselhos. Obrigado por contribuir em minha formação como pesquisador e pessoa.

À Profa. Célia Regina Orlandelli Carrer pela amizade, orientações e conselhos.

Ao Prof. Dr. César Gonçalves de Lima, Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP, pela amizade e assessoria nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Mariza Pires de Melo e MSc. Silvana Marina Piccoli Pugine pela amizade e auxílio teórico e técnico na elaboração desta tese.

Ao Chefe de departamento, Prof. Dr. João Alberto Negrão pela confiança em meu trabalho, e a todos os funcionários do Departamento de Ciências Básicas (ZAB).

Ao Dr. Fábio Rosa Sussel da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pela doação dos peixes e instalações para realização dos experimentos.

A toda equipe da biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (FZEA/USP).

A todos os amigos ao longo desta jornada em especial à Dra. Mariene Miyoko Natori (Bitoca).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

OLIVEIRA, R.H.F. **Potencial mitigador do óleo de cravo sobre as respostas fisiológicas ao estresse de exposição aérea e de transporte no lambari, *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000).** 2016. 97 p. Tese - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Para avaliação do potencial anestésico do óleo de cravo na mitigação dos efeitos fisiológicos do estresse de exposição aérea e de transporte do lambari, *A. altiparanae*, foram realizados dois experimentos. No primeiro, fêmeas adultas ($n = 80$) foram submetidas a quatro tratamentos: controle, anestesia (óleo de cravo 50 mg.L^{-1}), estresse (exposição aérea durante 5 minutos) e anestesia prévia ao estresse. Registraram-se os níveis plasmáticos de cortisol, glicose e lactato, o hematócrito, índice hepatossomático (IHS), as concentrações de glicogênio hepático e muscular branco, a peroxidação lipídica e a atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), catalase (CAT) e glutathione redutase (GR). Os dados foram submetidos à ANOVA, comparando-se as médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). No segundo experimento, avaliaram-se a concentração adequada e os efeitos do anestésico, combinado ou não ao NaCl (sal), sobre as respostas ao estresse de transporte simulado em juvenis ($n = 1.269$). Foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3×3 ($0, 3$ e 6 g.L^{-1} de NaCl; $0, 5$ e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ do anestésico). Os dados foram submetidos à ANOVA com estudo de regressão ($p < 0,05$). No primeiro experimento, observou-se elevação da glicose ($53,9\%$) após a anestesia e/ou o estresse. O estresse elevou os níveis de cortisol ($146,6\%$), de lactato ($294,6\%$) e a peroxidação lipídica no músculo branco (45%) e reduziu o glicogênio muscular ($40,1\%$). O hematócrito aumentou $7,9\%$ após o estresse ou a anestesia. O glicogênio hepático e o IHS não diferiram entre os tratamentos. A anestesia ou o estresse não alteraram a atividade da LDH, mas reduziram a atividade da CAT ($46,1\%$) e da GR ($30,3\%$). No segundo experimento observou-se redução linear da glicose em função das diferentes concentrações de anestésico, na presença de sal (3 g.L^{-1}), e redução quadrática desta variável em função das concentrações crescentes de sal, na presença de anestésico ($7,5 \text{ mg.L}^{-1}$). O sal ou anestésico reduziram linearmente o cortisol, entretanto, não houve alteração do hematócrito e do IHS. A adição crescente de sal aumentou linearmente o glicogênio hepático, elevou de forma quadrática o glicogênio muscular e reduziu linearmente o lactato. A anestesia provocou aumento linear do glicogênio muscular e não alterou a peroxidação lipídica, variável que aumentou de forma quadrática em função do acréscimo de sal. A LDH reduziu linearmente, em função das concentrações crescentes de sal, e houve efeito quadrático da interação sal e anestésico nesta resposta. A adição do anestésico provocou redução linear na atividade da CAT e a atividade da GR foi elevada pela interação entre sal e anestésico. Conclui-se que a exposição aérea e o transporte caracterizam-se como agentes estressores em lambaris, reduzindo o bem-estar e a qualidade do pescado. O óleo de cravo na concentração 50 mg.L^{-1} mitiga as respostas fisiológicas ao estresse e não provoca a peroxidação lipídica, porém não evita esta resposta causada pela exposição aérea. O óleo de cravo e o sal nas concentrações 5 e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e 3 a 6 g.L^{-1} , respectivamente, isolados ou associados, são seguros e eficazes para mitigar os efeitos do estresse de transporte no lambari.

Palavras-chave: Anestesia. Eugenol. Exposição Aérea. Peixes. Transporte

ABSTRACT

OLIVEIRA, R.H.F. **Mitigating potential of clove oil on the physiological stress responses of lambari, *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & Britski, 2000) to air exposure and transporting.** 2016. 95 p. Tese - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The effects of clove oil anesthetic on mitigating the physiological stress responses to air exposure and simulated transporting were evaluated in lambari (*A. altiparanae*). In the first experiment, adult females ($n = 80$) were subjected to four treatments: control, anesthesia (clove oil 50 mg L^{-1}), stress (5 min air exposure) and pre-anesthesia associated to stress. Cortisol, glucose and lactate levels, hematocrit, hepatosomatic index (HSI), liver and muscle glycogen content, lipid peroxidation level and the enzymatic activity of lactate dehydrogenase (LDH), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), were recorded. Data were analyzed by ANOVA, comparing the means by Tukey's test ($P < 0.05$). In the second experiment the potential of clove oil and sodium chloride (salt) added to water in mitigating the stress responses to simulated transporting was evaluated in 1.269 female juveniles. The experiment was conducted in a factorial design 3×3 (0, 3, 6 g.L^{-1} salt; 0, 5, 7.5 mg.L^{-1} clove oil) and data were submitted to ANOVA ($p < 0.05$). In the first experiment, we observed glucose increase (53.9%) after anesthesia and/or stress. The stress increased cortisol levels (146.6%), lactate (294.6%) and lipid peroxidation in white muscle (45%) and decreased glycogen (40.1%). The hematocrit increased 7.9% after stress or anesthesia and the liver glycogen and HSI did not changed between treatments. Anesthesia or stress did not affect the LDH activity, but reduced the activity of CAT (46.1%) and GR (30.3%). In the second experiment a reduction of blood glucose was observed when the anesthetic was associated to salt (linear) or salt was associated to anesthetic (quadratic). The salt or anesthetic decreased the cortisol (linear) but did not affected hematocrit or hepatosomatic index. The salt increased glycogen in liver (linear) and white muscle (quadratic), but reduced the lactate (linear). Anesthesia increased the muscle glycogen (linear) and did not affect the lipid peroxidation that was increased (quadratic) by salt. The LDH activity was reduced (linear) by increasing concentrations of salt or its association with the anesthetic (quadratic). Clove oil decreased CAT activity (linear) and when associated to salt increased the GR activity. We concluded that air exposure and transporting are stressful situations that reduces welfare and meat quality and that clove oil (50 mg.L^{-1}) mitigates the physiological responses to stress and does not cause lipid peroxidation but does not prevent this response resulting from air exposure. The clove oil and the salt (5 and 7.5 mg.L^{-1} and 3 to 6 g.L^{-1} , respectively), either in its isolated or combined form, are safe and effective in mitigating the stress effects of transporting in lambari.

Keywords: Air exposure. Anesthesia. Eugenol. Fish. Transporting

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1.....	4
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1 O estresse de transporte	4
1.2 A espécie estudada	7
1.2 Definição, mecanismos e efeitos fisiológicos do estresse	9
1.4 O estresse de exposição aérea.....	14
1.5 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	16
2. OBJETIVOS	19
3. HIPÓTESES.....	19
4. JUSTIFICATIVAS.....	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Avaliação do potencial do óleo de cravo na atenuação das respostas fisiológicas ao estresse decorrente da exposição aérea	21
5.2 Avaliação dos efeitos da adição do óleo de cravo, associado ao cloreto de sódio na água, sobre as respostas fisiológicas ao estresse de transporte em lambaris.....	31
Capítulo 2.....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1 Avaliação do potencial do óleo de cravo na atenuação das respostas fisiológicas ao estresse decorrente da exposição aérea.	38
Capítulo 3.....	52
6.2 Avaliação dos efeitos da adição do óleo de cravo, associado ao cloreto de sódio na água, sobre as respostas fisiológicas ao estresse de transporte em lambaris.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de Lambari <i>A. altiparanae</i>	7
Figura 2 - A) Exemplar de <i>A.x altiparanae</i> Macho detalhe nadadeira anal áspera (espículas), B) Exemplar de <i>A. altiparanae</i> Fêmea detalhe nadadeira anal lisa	8
Figura 3 - Quadro transcrito de Pereira-da-Silva (2015) do esquema geral das respostas fisiológicas primárias, secundárias e terciárias ao estresse em peixes teleósteos de água doce	11
Figura 4 - Procedimentos de recepção, aclimação e acondicionamento dos peixes nas unidades experimentais	22
Figura 5 - setas em vermelho coleta de sangue e preparação do hematócrito, setas azuis coleta de sangue para realização de ensaio de cortisol plasmático...	25
Figura 6 - Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído (MDA) em amostras de musculatura branca de lambaris	27
Figura 7 - Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA (A) e Tela de análise de enzimas (B).....	28
Figura 8 - Peixes submetidos à captura (A), e exemplar em estresse de exposição aérea durante 5 minutos (B)	29
Figura 9 - Peixes submetidos à anestesia (A), e exemplar em anestesia profunda (B)	30
Figura 10 - Planilha de indução hormonal de lambaris e reagentes (A) e Lambari submetido a injeção intraperitoneal de solução de hipófise para reprodução induzida (B). A espécie estudada:	31
Figura 11 - Procedimento de despesca dos lambaris obtidos por meio de desova induzida e mantidos em viveiro na Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA - UPD Pirassununga).....	33
Figura 12 - Embalagens de transporte de peixes (A) veículo para simulação de transporte de lambaris <i>A. altiparanae</i> (B) A espécie estudada:	34

Figura 13 - Lambaris (<i>A. altiparanae</i>) submetidos ao atordoamento em gelo (A) e posterior coleta de sangue por punção caudal (B).....	34
Figura 14 - Quantificação de glicose sanguínea (mg.dL^{-1}) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia.	40
Figura 15 - Quantificação de cortisol plasmático (ng.mL^{-1}) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia.	41
Figura 16 - Quantificação do Hematócrito (%) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia.....	43
Figura 17 - Quantificação do Glicogênio muscular (mg.g^{-1}) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia	45
Figura 18 - Quantificação do lactato (mg.dL^{-1}) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia	46
Figura 19 - Atividade da enzima catalase expressa em ($\text{nmol.min.mg proteína}^{-1}$) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia	48
Figura 20 - Atividade da enzima glutathione redutase expressa em ($\text{nmol.min.mg proteína}^{-1}$) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia.....	49
Figura 21 - Quantificação da peroxidação lipídica TBA ($\text{mg MDA Kg tec úmido}^{-1}$) em lambaris <i>A. altiparanae</i> submetido anestesia, estresse e estresse e anestesia	50
Figura 22 - Quantificação de glicose sanguínea (mg.dL^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl.	56
Figura 23 - Quantificação de cortisol plasmático (ng.mL^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}) ou de óleo de cravo (mg.L^{-1}).	57
Figura 24 - Quantificação de glicogênio hepático (mg.g^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}).	59
Figura 25 - Quantificação de glicogênio muscular (mg.g^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}) ou de óleo de cravo (mg.L^{-1}).	60

Figura 26 - Quantificação de lactato plasmático (mg.dL^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}). 61

Figura 27 - Quantificação de peroxidação lipídica ($\text{mg.MDA.kg tecido.úmido}^{-1}$) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}). 63

Figura 28 - Quantificação de atividade da enzima lactato desidrogenase ($\mu\text{mol.min.mg proteína}^{-1}$) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}) e interação com as concentrações de óleo de cravo (0, 5, e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$) 64

Figura 29 - Quantificação da atividade da enzima catalase ($\text{nmol.min.mg.proteína}^{-1}$) em função das concentrações crescentes de óleo de cravo (mg.L^{-1}). 66

Figura 30 - Quantificação da atividade da enzima glutathione redutase ($\text{nmol.min.mg proteína}^{-1}$) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}) ou óleo de cravo (mg.L^{-1}). 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental estabelecido para avaliação dos efeitos do anestésico óleo de cravo (50 mg.L^{-1}) sobre as respostas fisiológicas ao estresse em juvenis de lambari (*A. altiparanae*)..... 23

Tabela 2 - Critérios de indução e de recuperação utilizados para determinação da eficácia do óleo de cravo como anestésico em alevinos de lambari (*A. altiparanae*) 24

Tabela 3 - Delineamento experimental estabelecido para avaliação dos efeitos da adição do anestésico óleo de cravo e/ou do cloreto de sódio sobre as respostas fisiológicas ao estresse simulado de transporte (densidade de 140 g.L^{-1} de peixe) em lambaris (*A. altiparanae*). 32

Tabela 4 - Respostas fisiológicas da indução anestésica com óleo de cravo (50 mg.L^{-1}) sobre o estresse de exposição aérea durante cinco minutos em juvenis de lambari *A. altiparanae*. 39

Tabela 5 - Tabela descritiva dos valores médios ($n=3$) das variáveis indicadoras da qualidade de água registrados após transporte simulado de lambaris (*A. altiparanae*) na densidade de 300 g.L^{-1} 52

Tabela 6 - Valores médios ($\pm$ erros padrões) das variáveis fisiológicas registradas para as diferentes combinações dos níveis de NaCl ($0, 3$ e 6 g.L^{-1}) e de óleo de cravo ($0, 5$ e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$) antes (basal) e após transporte simulado (5 h) em lambaris *A. altiparanae* 55

INTRODUÇÃO GERAL

A prática da produção aquícola é muito dinâmica e novas tecnologias têm sido empregadas para garantir a maior produtividade destes organismos e, conseqüentemente, um maior ganho financeiro. Atualmente, o ramo da piscicultura brasileira é composto pela grande maioria de propriedades rurais dotadas de tanques, barragens ou açudes e que priorizam a atividade de engorda e venda de peixes para consumo e processamento.

Há uma grande preocupação por parte dos produtores e pesquisadores na questão de qualidade nutricional da ração e testes de novos nutrientes visando uma melhor conversão alimentar, além de técnicas de reprodução mais eficientes, estudos sobre densidade em viveiros e tanques rede, mas ainda são necessários estudos sobre o estresse de transporte e suas conseqüências para os peixes.

O transporte dos peixes é uma das práticas mais importantes, entretanto, pouco enfocado ou até mesmo negligenciado por parte dos produtores, pois para muitos, basta preencherem uma embalagem com água e inflar com oxigênio ao acaso para obtenção do sucesso neste manejo, principalmente em curtas distâncias, não levando em consideração a densidade de estocagem dos peixes, as variações dos parâmetros físico-químicos da água e as condições do veículo para transporte, entre outros fatores.

O estresse está presente no transporte desde o momento da despesca, onde ocorrem choques mecânicos das redes no corpo dos peixes produzindo ferimentos que são alvos de patógenos oportunistas. A temperatura da água também não é considerada nesta atividade e, muitas das vezes, é inadequada, resultando ao organismo choque térmico, causando efeitos negativos em sua sanidade. A qualidade da água como pH, concentrações de oxigênio dissolvido, amônia e nitrito também devem ser levadas em conta durante o transporte, bem como a densidade de estocagem.

Algumas alternativas têm sido empregadas para a redução do estresse durante o transporte, umas delas a depuração, onde o peixe é submetido a restrição alimentar, prática cujo tempo varia de acordo com a espécie e hábito alimentar, pois com o trato digestório vazio há menor liberação de excretas e uma melhor manutenção da qualidade da água. Atrelada a esta prática há o uso de cloreto de sódio que de forma aleatória é

dissolvido em água e que, pode proporcionar um equilíbrio osmótico entre o peixe e o meio e auxiliar na produção de muco, protegendo-os de patógenos. Outras formas para a redução do estresse também têm sido empregadas como o uso de anestésicos cuja função é reduzir a percepção aos estímulos externos e sua atividade locomotora e, portanto, possíveis danos físicos. Dentre os agentes anestésicos mais utilizados para esta prática estão o óleo de cravo, benzocaína, 2-fenoxietanol, entre outros.

Em relação ao transporte, não foram encontradas referências ao Lambari *Astyanax altiparanae*, cuja descrição e hábitos serão descritos na revisão de literatura desta tese. Este peixe já foi considerado um invasor de viveiros, mas, nos dias atuais, apresenta potencial zootécnico fazendo-se necessário o estudo de sua biologia, fisiologia e comportamento para obtermos uma maior produtividade.

Esta tese, disposta na forma de três capítulos, apresenta o resultado de dois experimentos realizados. No **Capítulo 1** é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o manejo de transporte, a utilização do óleo de cravo e do sal como mitigadores do estresse, a biologia da espécie *A. altiparanae*, os mecanismos de estresse, os efeitos do estresse de exposição aérea sobre a oxidação lipídica. No **Capítulo 2**, cujos dados parciais já foram submetidos à publicação que se encontra no prelo da revista **Aquaculture Research** com o Título "Physiological responses of lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000) to air exposure", são discutidos os efeitos da utilização do óleo de cravo como agente mitigador do estresse de exposição aérea na espécie.

No **Capítulo 3** são apresentados os resultados dos efeitos do uso do óleo de cravo, combinado ou não ao cloreto de sódio, na mitigação do estresse de transporte, ressaltando-se que parte dos resultados foi, também, apresentada em 2015, na forma de pôster no **II Simpósio de Pós-Graduação da FZEA/USP**, quando foi recebida uma menção honrosa de mérito acadêmico.

O projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (2012.1.670.74.3). Portanto, todos os procedimentos experimentais envolvidos nos experimentos seguiram os princípios da Resolução no. 592 de junho de 1992, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e os Princípios Éticos na

Experimentação Animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Esta tese foi também financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na forma de Auxílio Pesquisa Processo 2012/24698-4.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O estresse de transporte

O transporte dos peixes consiste em uma das práticas rotineiras e também mais importantes no manejo e comercialização desses organismos aquáticos. São observadas etapas potencialmente estressoras como o procedimento de captura, as altas densidades nas embalagens ou caixas de transporte e também outros fatores como a variação de temperatura (choque térmico), qualidade da água, além do ruído e movimentação do veículo. Visando a importância e relevância desta prática, estudos têm sido realizados para avaliação dos efeitos fisiológicos nos peixes e estabelecimento de normas e padrões que minimizem os impactos decorrentes deste manejo (PIPER et al., 1982; WEDEMEYER 1996; 1997; CARMICHEL; TOMASSO; SCHWEDLER, 2001; HARMON, 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

Um transporte considerado eficiente deve levar em consideração basicamente a sanidade do peixe, a concentração de oxigênio dissolvido na água, o pH, CO₂ e amônia, a temperatura da água, o tempo de transporte, o estresse e suas alterações bioquímicas no animal (BERKA, 1986). De um modo geral, o sucesso desta rotina consiste em manter os peixes em uma maior densidade possível, com uma menor quantidade de água, sem que sejam observadas de maneira pronunciada as respostas do estresse, redução da qualidade da água ou mortalidade durante, ou após o período de transporte (GROTTUM; STAURNES; SIGHOLT, 1997; OLIVEIRA, et al., 2009).

Estudos e até mesmo tentativas de forma empírica, têm sido conduzidos na tentativa de minimizar a quantidade de estresse imposta durante a situação de transporte (HARMON, 2009). Esta prática adversa ao peixe é caracterizada pela perda do status fisiológico “normal” pois o animal está inserido em uma condição que afeta negativamente o seu bem-estar, e durante esse manejo, há um estresse pronunciado que afeta a capacidade de ajuste fisiológico e que compromete temporariamente o crescimento, suscetibilidade a doenças e infecções e em casos mais extremos até a mortalidade (WEDEMEYER, 1996; FRANCIS-FLOYD, 2002; GOMES et al., 2003a).

No transporte, assim como em qualquer procedimento que cause estresse, é observado um aumento da concentração sanguínea de epinefrina, e este hormônio provoca alterações na permeabilidade das brânquias, e em alguns casos é observada a mortalidade imediata dos peixes associada a este tipo de manejo, fato este atribuído às alterações iônicas do sangue, por meio da perda passiva de íons e influxo de água quando em ambientes de água doce, pois são animais hipertônicos em relação ao meio (WENDELAAR BONGA, 1997; MCDONALD; MOYLE; CECH, 1988; MILLIGAN, 1997). Portanto, se faz necessária a manutenção de ambientes isosmóticos, ou próximos a essa condição, pois reduz o gradiente entre o plasma e o meio externo e, assim, minimiza os gastos energéticos da regulação osmótica e iônica, atenuando os efeitos do estresse (REDDING; SCHRECK, 1983).

Para a redução dos impactos do estresse durante o manejo e transporte de várias espécies de peixes, tem sido utilizado como uma opção economicamente viável e de fácil aquisição e com propriedades antissépticas o cloreto de sódio (NaCl) que nesta tese será referido como “sal” para uma melhor fluência na leitura do texto (BARTON; PETER, 1982; CARNEIRO; URBINATI, 2001; GOMES et al., 2003b; OLIVEIRA, et al., 2009). O sal regula a homeostase e reduz o gradiente osmótico entre o plasma e o meio externo, além de estimular a produção de muco que protege os peixes seja em lesões durante a captura, e ação de patógenos oportunistas (MAZIC; SIMCO; PARKER, 1991; WURTS, 1995). Como já dito anteriormente, o uso do sal é uma das formas de se tentar reduzir o estresse, mas a sua administração é conduzida ainda de forma empírica pelos produtores, sendo assim necessário estudos para a verificação da concentração ideal para seu uso no transporte (GOMES et al., 2003b).

O uso de sal na água reduz os níveis de cortisol plasmático em peixes como o tambaqui *Colossoma macropomum* (GOMES et al., 2003b), matrinxã *Brycon cephalus* (CARNEIRO; URBINATI, 2001) e truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (BARTON; PETER, 1982), em condições de estresse de transporte e pós-transporte, entretanto o mesmo resultado não foi observado para pirarucu *Arapaima gigas* (GOMES et al., 2006).

O sal na concentração de 6 g.L⁻¹, na água de transporte da espécie matrinxã (*B. cephalus*), proporcionou redução nas respostas fisiológicas ao estresse de manejo (CARNEIRO; URBINATTI, 2001; 2002). Para truta (*O. mykiss*) e pirarucu (*A. gigas*)

também se registraram efeitos positivos na redução do estresse durante o transporte (BARTON; PETER, 1982; CARNEIRO; URBINATI, 2001; GOMES et al., 2006). Para peixes de água doce são sugeridas concentrações que variam entre 5 a 10 g.L⁻¹ na redução do estresse de transporte (HARMON, 2009). Para transporte de alevinos da espécie *A. altiparanae* foi observado que o sal na concentração de até 6 g.L⁻¹, não causou mortalidade, e reduziu os efeitos do estresse durante o transporte (SALARO et al., 2015).

Algumas alternativas além do sal têm sido empregadas como, por exemplo, drogas anestésicas como a benzocaína, óleo de cravo e 2-fenoxietanol, entre outras, que são utilizadas para o manejo e ou transporte de peixes (OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA-DA-SILVA et al., 2009; WEBER et al., 2011). Estes fármacos induzem à perda parcial ou completa da percepção dos estímulos externos e, portanto, os possíveis danos físicos e efeitos do estresse (SUMMERFELT; SMITH, 1990; IWAMA; ACKERMAN, 1994; ROSS; ROSS, 2008).

O óleo de cravo é um anestésico de origem tropical extraído do caule, das flores e das folhas das espécies *Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica*, e tem como princípio ativo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), considerado seguro para humanos em procedimentos dentários (NAGABABU; LAKSHMAIAH, 1992), para animais e o ambiente. Esta droga deprime o sistema nervoso central por meio da interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-amino-butírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) (YANG et al., 2003). Para espécies como a truta arco-íris *O. mykiss*, carpa comum *Cyprinus carpio*, e rabbitfish *Siganus lineatus* concentrações entre 25 a 120 mg L⁻¹ foram consideradas eficazes (ENDO et al., 1972; HIKASA et al., 1986; SOTO; BURHANUDDIN, 1995; ANDERSON; MCKINLEY; COLAVECCHIA, 1997). A concentração de 50 mg L⁻¹ foi estabelecida como eficiente e segura para indução à anestesia profunda em até 1,5 minuto e de anestesia cirúrgica em até 3,3 minutos de exposição para alevinos de lambari *A. altiparanae*, sendo observado mortalidade somente para a concentração de 150 mg.L⁻¹ (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2009).

1.2 A espécie estudada

Os lambaris pertencem ao gênero *Astyanax* (BAIRD & GIRARD 1854), grupo comum e diversificado da classe dos Actinopterygii, ordem dos Characiformes, família Characidae, subfamília Tetragonopterinae (GARUTTI; BRITSKI, 2000; ABIMORADI; CASTELLANI, 2011). São caracterizados como peixes de porte reduzido, encontrados na região neotropical e representados nas bacias hidrográficas do Brasil por aproximadamente 100 espécies (GÉRY, 1977; GARUTTI; BRITSKI, 2000; ORSI; CARVALHO; FORESTI, 2004).

Dentre as espécies de lambari destaca-se o *Astyanax altiparanae* (**Figura 1**), conhecido também como lambari-do-rabo-amarelo ou tambuí nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil, piaba na região Nordeste, majorra e ou também sardinha de água doce, nos países da América Latina. Anteriormente esta espécie era classificada como *Astyanax bimaculatus* devido a presença de uma mancha umeral de forma oval e uma mancha no pedúnculo caudal que se estende até as extremidades dos raios caudais medianos. A espécie recebeu a nova nomenclatura *A. altiparanae* após revisão de Garutti e Britski (2000), porém todos os demais peixes do "grupo bimaculatus" encontrados continuam com a denominação *A. aff. bimaculatus*, enquanto é aguardada para estes uma designação mais precisa (KAVALCO et al., 2011).

Figura 1 - Exemplar de Lambari *A. altiparanae*

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Os lambaris vivem na região bentopelágica do corpo hídrico, são estritamente de água doce, apresentam hábitos diurnos e possuem boa percepção visual. Peixes desse gênero forrageiam todos os níveis tróficos, com habilidades de mudança em sua dieta

por questões ambientais ou restrições alimentares. É uma espécie onívora, com tendência à insetivoria, podendo alimentar-se de vegetais (sementes, frutos, algas e macrófitas) e animais (insetos aquáticos e terrestres) (LOBÓN-CERVIÁ; BENNEMANN, 2000; ANDRIAN; SILVA; PERETTI, 2001; ORSI, 2001; ABIMORADI; CASTELLANI, 2011). Considerado inicialmente como invasor dos viveiros representa, na atualidade, uma espécie de interesse para a piscicultura, tendo em vista a alta prolificidade, facilidade para obtenção de alevinos, adaptação às condições ambientais e crescimento precoce e seu peso comercial é obtido em até três meses, variando de 10 a 15g aproximadamente, embora possam ser encontrados exemplares de até 60 g (PORTO-FORESTI et al., 2001; GARUTTI, 2003; ABIMORADI; CASTELLANI, 2011).

A espécie tem seu período reprodutivo na primavera e de maneira induzida, pode desovar várias vezes ao ano, desenvolvendo (FÁVARO, 2002). Desenvolve a sua maturação sexual em aproximadamente quatro meses de idade em cativeiro e apresenta dimorfismo sexual (**Figura 2**) externo com machos geralmente menores e fusiformes (7 a 9 cm) comparados às fêmeas (12 a 15 cm), que apresentam crescimento mais precoce e corpo arredondado (SANTOS et al., 1995; PORTO-FORESTI et al., 2001; PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005; SATO et al., 2006).

Figura 2 - A) Exemplar de *A. altiparanae* macho: detalhe nadadeira anal áspera (espículas), B) Exemplar de *A. altiparanae* fêmea: detalhe nadadeira anal lisa.

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Outra característica relacionada ao dimorfismo da espécie é que, nas fêmeas, há uma área de coloração avermelhada decorrente de uma demanda sanguínea na região ventral do corpo nas bases da inserção das nadadeiras peitorais e ventrais. Nos machos, uma importante característica que se pode observar são as espículas sensíveis ao toque na nadadeira anal (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005).

Quanto ao seu valor biológico, a espécie é considerada um dos principais elos da cadeia alimentar, sendo parte significativa da dieta de peixes carnívoros e elemento importante da manutenção do equilíbrio biológico no ecossistema, além de também atuar no controle biológico de larvas de insetos (GARUTTI; BRITSKI, 2000; PAULA, 2009).

No cativeiro é um animal que se adapta facilmente ao ambiente e aceita uma ampla variedade de alimentos, além de possuir alta taxa de crescimento (FÁVARO, 2002). Sua criação pode ser recomendada para complementar a renda de agricultores familiares, devido ao pouco espaço necessário para o cultivo (PAULA, 2009).

É ainda uma espécie com mercado restrito, mas com possibilidades de expansão, devido ao sabor de sua carne ser bem aceito, seu potencial para a aquariofilia em virtude de seu tamanho e brilho das escamas, e ainda para piscicultura intensiva, podendo ser industrializado na forma de conserva denominada “sardinha de água doce” (ANDRADE et al., 1985; HAYASHI et al., 2004; PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005).

Outra forma de comercialização do lambari está atrelada ao mercado de iscas vivas para a pesca esportiva de carnívoros, sendo o custo médio de produção de R\$ 0,08 (SABBAG et al., 2011), e o preço de revenda de R\$ 0,16, (SUSSEL, 2016)¹. Portanto, a espécie apresenta potencial zootécnico e de exploração comercial e se faz necessário um estudo aprofundado de sua biologia, aspectos fisiológicos e etologia.

1.2 Definição, mecanismos e efeitos fisiológicos do estresse

O estresse é um termo que foi definido pelo médico Hans Selye, e também pode ser denominado de Síndrome Geral de Adaptação, e que abrange um conjunto de

¹ Consulta informal ao pesquisador Científico Dr. Fábio Rosa Sussel – Agência Paulista de Tecnologia do agronegócio (APTA) Polo Pirassununga.

respostas fisiológicas de “ajustes”, que são iniciadas por situações adversas e que proporcionam o restabelecimento da homeostase de um organismo. Estas respostas adaptativas são mediadas por mecanismos internos do sistema nervoso, imunológico e endócrino e são responsáveis pelos ajustes fisiológicos dos organismos, e também nos peixes quando confrontados a um agente estressor (SELYE, 1950; 1973; TORT, 2011).

Os peixes apresentam um comportamento semelhante aos vertebrados superiores, desencadeado pelo próprio organismo e denominado “fight-or-flight” (“luta ou fuga”), resposta que está diretamente relacionada à duração, intensidade e tipo de estímulo estressor (BARTON 1997; MORGAN; IWAMA, 1997). Fisiologicamente ocorre a mudança metabólica de anabolismo para catabolismo, com gasto de reservas energéticas que não seriam utilizadas pelo organismo em situação de homeostase (PICKERING, 1981; PICKERING; CHRISTIE, 1981; WENDELAAR BONGA, 1997; IWAMA, 1997; CORREA et al., 2003). Durante o estresse há um aumento do gasto energético para manutenção do equilíbrio iônico (BARTON; IWAMA, 1991).

O estresse nos peixes pode ser desencadeado por fatores físicos (manejos inadequados, choques mecânicos), químicos (alterações de pH, oxigênio dissolvido, poluição) ou biológicos (presença de coespecíficos ou predadores) (WINTON, 2001; HARMON, 2009). Pode ser classificado em três categorias: primário, também denominado de agudo, caracterizado pelo aumento das catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) e hormônios corticosteroides (cortisol); secundário, que resulta na elevação de substratos como da glicose e lactato, redução do glicogênio hepático, alterações osmóticas e das características imunológicas e sanguíneas, além da redução nas concentrações de íons no sangue e aumento no conteúdo hídrico dos peixes dulcícolas; terciário que se caracteriza principalmente pela redução da capacidade reprodutiva e do crescimento, aumento da susceptibilidade a patógenos oportunistas e mortalidade (MAZEAUD; MAZEAUD; DONALDSON, 1977; EDDY, 1981; BARTON, 2002) (**Figura 3**).

Figura 3 - Quadro transcrito de Pereira-da-Silva (2015) do esquema geral das respostas fisiológicas primárias, secundárias e terciárias ao estresse em peixes teleósteos de água doce.

EFEITOS TERCIÁRIOS

Apetite e ingestão alimentar
Eficiência de conversão alimentar, taxa de crescimento
Tolerância térmica e à hipóxia
Atividade de natação
Proliferação de células cerebrais, aprendizagem e memória
Tolerância a agentes estressores adicionais
Funções imunes
Sobrevivência
Qualidade do pescado

Agressividade
Apoptose de células branquiais, alterações comportamentais

A reação de estresse é desencadeada no instante imediato em que há a percepção de uma situação que provoque ameaça ao animal, quando fibras nervosas simpáticas são estimuladas pelo sistema nervoso central, liberando as catecolaminas rapidamente por meio de receptores colinérgicos, detectadas imediatamente na circulação sanguínea dos peixes (MAZEAUD; MAZEAUD; DONALDSON, 1977; RANDALL; PERRY, 1992; REID; BERNIER; PERRY, 1998 et al., 1996; 1998). A intensa liberação das catecolaminas, resulta no aumento imediato da glicose como aporte energético, no sangue dos peixes por meio da glicogenólise hepática. (WENDELAAR BONGA, 1997).

Outra via que atua de forma concomitante em condições de estresse é a do eixo hipotálamo-hipofisário-interrenal (HPI), quando ocorre a liberação do hormônio liberador da corticotropina (CRH) no hipotálamo, responsável por estimular a glândula pituitária (hipófise anterior) que libera, por sua vez, o hormônio adenocorticotrófico (ACTH), que estimula a liberação dos hormônios corticosteroides (cortisol) pelas células interrenais localizadas no rim cefálico (WENDELAAR-BONGA, 1997; BARTON; MORGAN; VIAJAYAN, 2002).

A liberação do cortisol é detectada via plasma sanguíneo de maneira mais pronunciada a partir de 30 minutos até 1 hora após exposição ao agente estressor (MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; BARTON, 2002; IWAMA; AFONSO; MATHILAKATH, 2004). Em condições de estresse este hormônio mobiliza a glicose como substrato energético com o objetivo de suprir a demanda metabólica, contribuindo para manutenção dos estoques de glicogênio no fígado por meio da gliconeogênese hepática, a partir de fontes como aminoácidos, lactato e glicerol (SCHRECK, 1981; WEDEMEYER, 1996; VIJAYAN et al., 1997; MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; BARTON; MORGAN; VIJAYAN, 2002; IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006).

Os níveis de glicose e cortisol plasmáticos são utilizados rotineiramente na pesquisa para se avaliar o bem-estar e podem indicar em qual fase do estresse o organismo se encontra (primário ou secundário) permitindo, assim, a proposição de alternativas para reversão desta situação (ROBERTSON et al., 1987; WEDEMEYER; BARTON; MCLEAY, 1990; BARTON; IWAMA, 1991; MORGAN; IWAMA, 1997; WENDELAAR BONGA, 1997; MOOMSEN et al., 1999 EVANS et al., 2003; IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006; OLIVEIRA et al., 2009). A glicose sanguínea é um parâmetro

confiável e muito utilizado para avaliação das respostas dos peixes ao estresse, podendo ser monitorada por meio de equipamentos portáteis, principalmente utilizados nas condições de campo (EVANS; SHOEMAKER; KLESIUS, 2003). Outro parâmetro rotineiramente utilizado para esta avaliação é o lactato, metabólito que apresenta rápida elevação na circulação e que está relacionado à hidrólise do glicogênio resultante do aumento da atividade muscular e locomotora dos peixes (VIJAYAM et al., 1997; GOMES et al., 2006).

As alterações decorrentes da exposição dos animais aos diferentes agentes estressores podem ser detectadas por meio de parâmetros hematológicos, que são importantes ferramentas para avaliação do estado fisiológico e sanidade dos peixes (SVOBODOVÁ; VYSUKOVÁ, 1991; MORGAN; IWAMA, 1997; TAVARES-DIAS et al., 2000; RANZANI-PAIVA; FELIZARDO; LUQUE, 2005). Entre as variáveis hematológicas, as alterações do hematócrito, de eritrócitos, do número total de células vermelhas e da hemoglobina podem indicar que os peixes sofreram alguma variação osmorregulatória característica de estresse. O hematócrito é alterado após exposição dos peixes a um estresse crônico sendo, portanto, uma das respostas secundárias do estresse (HOUSTON; DOBRIC; KAHURANANGA, 1996; MORGAN; IWAMA, 1997; MORALES et al., 2005).

Outra forma de se avaliar o estresse está relacionada à quantidade de substratos energéticos presentes nos tecidos e órgãos dos peixes, sendo o glicogênio uma das principais reservas que estão disponíveis no fígado e músculo dos teleósteos. Sua concentração pode variar em virtude do estresse ambiental causado por alterações de pH, de oxigênio dissolvido, da salinidade e também nas situações onde os peixes são submetidos a esforços natatórios como na captura, nos manejos inadequados e durante a exposição aérea (LENINGHER, 1971; SOENGAS; DALLA VIA et al., 1994; ALDEGUNDE; ANDRÉS, 1995; MORAES; OLIVEIRA; RANTIN, 1996; BIDINOTTO; SOUZA; MORAES, 1997; WENDELAAR BONGA, 1997; ROACH, 2002).

1.4 O estresse de exposição aérea

Um dos fatores que ocorrem na piscicultura é a redução das concentrações de oxigênio na água que pode ser decorrente do aumento da densidade de estocagem, da

alimentação, da eutrofização, da elevação da temperatura e do “bloom” de algas, entre outros, que podem representar uma importante fonte de estresse agudo ou crônico para os peixes (PICKERING, 1981; BARTON; PETER, 1982; SUMPTER; DYE; BENFEY, 1986; BARTON; IWAMA, 1991; DELANEY; KLESIUS, 2004; O’CONNOR; POTTINGER; SNEDDON, 2011).

Independente da espécie ou de sua rusticidade, os peixes apresentam respostas fisiológicas semelhantes e características quando são submetidos à redução das concentrações de oxigênio na água. Nesta condição são desencadeadas as reações primárias de estresse (aumento das catecolaminas e cortisol) e ajustes demais fisiológicos como alterações osmo-regulatórias, metabólicas e imunológicas (MAZEAUD; MAZEAUD; DONALDSON, 1977; WEDEMEYER; MCLEAY, 1981; PICKERING; POTTINGER, 1995; HERBERT; STEFFENSEN, 2005).

Nas condições de criação intensiva, a exposição aérea e o confinamento em rede são procedimentos rotineiros e com potencial estressor, e essas práticas podem também serem utilizadas em pesquisas para avaliar o estresse nos peixes (SLOMAN et al., 2001; MORALES et al., 2005; GOMES et al., 2008; RAMSAY et al., 2009). O estresse de exposição aérea desencadeia a depleção do glicogênio hepático e elevações significativas dos níveis de cortisol, de glicose e do lactato (DALLA VIA et al., 1994; ARENDS et al., 1999; ACERETE et al., 2004; COSTAS et al., 2011).

Para o cortisol foram observadas maiores liberações deste hormônio após 30 minutos da submissão ao agente estressor na espécie cobia *Rachycentron canadum* e *Pseudoplatystoma corruscans*, e 1 hora após para a espécie *Senegalese solea* (FAGUNDES; URBINATTI, 2008; CNAANI; MCLEAN, 2009; TRUSHENSKI et al., 2010). Após um minuto de exposição aérea foram observadas elevações do cortisol na *Perca fluviatilis*, o que ocorreu após 3 minutos e acompanhado da elevação da glicose em *Sparus aurata* L. e após 5 minutos no lambari *A. altiparanae* (ARENDS et al., 1999; ACERETE et al., 2004; PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA; DELNERO, 2014). Também foram observadas elevações nas concentrações de lactato e de glicose em exemplares da espécie *Gasterosteus aculeatus* submetidos a hipóxia (O’CONNOR; POTTINGER; SNEDDON, 2011).

Outros substratos energéticos como o glicogênio hepático e muscular também são utilizados em situação de estresse de hipóxia, tendo sido observadas redução do glicogênio hepático acompanhada de aumento do muscular na traíra *Hoplias malabaricus* e apenas redução do glicogênio hepático na truta *Onchorynchus mykiss* nesta condição (VIJAYAN; MOON 1992; MORAES; OLIVEIRA; RANTIN, 1996).

Alternativas para inibir os efeitos do estresse têm sido pesquisadas como, por exemplo, o uso de sais e anestésicos como a *Lippia alba* e o óleo de cravo. Estes anestésicos promoveram a manutenção do cortisol em níveis basais após exposição aérea de exemplares de *Rhamdia quelen*, efeito semelhante observado em *A. altiparanae* após anestesia com mentol (CUNHA et al., 2010 a e b; PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA; DELNERO, 2014).

1.5 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

Para a realização dos processos metabólicos aeróbicos há consumo de oxigênio e consequente liberação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e como subprodutos desta reação temos o peróxido de hidrogênio, os ânions radicais superóxidos e os radicais hidroxilas. Entretanto, em situações patológicas ou de alterações na homeostase (estresse) há uma elevação não controlada dessas (EROs), denominada de estresse oxidativo (STOREY, 1996; ADAMS; GREELEY; RYON, 2000; SCANDALIOS, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo nos organismos aeróbios é ocasionado quando as enzimas de defesas antioxidantes não neutralizam totalmente essas EROs e há um desequilíbrio na detoxificação das células, o que resulta em efeitos deletérios, uma vez que as EROs podem reagir com as macromoléculas biológicas causando peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos nas organelas, membranas e ao DNA celular. Portanto, para combater a formação das EROs é necessária a atuação de sistemas enzimáticos e não enzimáticos (STOREY, 1996; ADAMS; GREELEY; RYON, 2000; SHI et al., 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; YONAR; SAKIN, 2011). Dentre as defesas antioxidantes podemos citar os sequestradores de baixo peso molecular como a glutatona, as enzimas catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona s-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) (STOREY, 1996; DROGE, 2002).

Em situações de estresse decorrentes da piscicultura, como hipóxia, a exposição aérea, os manejos e a restrição alimentar, os peixes respondem fisiologicamente de várias formas, e uma delas é o aumento das EROs que é caracterizado pela mudança do potencial redox da célula por meio da redução da cadeia de elétrons na mitocôndria e que é “combatida” pelas defesas antioxidantes (CHANDEL; SHUMACKER, 2000; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005). Nos peixes o estresse oxidativo pode resultar na elevação da peroxidação lipídica nos tecidos que é uma das alterações químicas mais importantes do pescado e a peroxidação pode ocorrer nas situações de estresse pré ou pós-abate, resultando em danos celulares. O estresse oxidativo é um processo primário de deterioração que se manifesta por mudanças nas características organolépticas e no valor nutricional, além da produção de compostos tóxicos nos tecidos do pescado (SANT’ANA; MANCINI-FILHO, 1995; JENSEN; LAURIDSEN; BERTELSEN, 1998; NUNES; BATISTA; CARDOSO, 2007).

A peroxidação lipídica, decorrente do estresse oxidativo, causa danos à membrana lipídica, perda da função celular e apoptose, e pode ser determinada por meio do ensaio de TBARs, cujo princípio baseia-se na formação de um complexo de coloração rósea resultante da reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais do processo da peroxidação lipídica (VINCKE, 1970; SOUTHHORN; POWIS, 1988; STOREY, 1996; HUANG et al., 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; MODESTO; MARTINEZ, 2010; VELISEK et al., 2011).

A exposição aérea é uma das ferramentas que podem ser utilizadas na pesquisa para avaliar o estresse oxidativo nos peixes e esta prática provoca a restrição da passagem de água pelas brânquias e corpo dos peixes, reduzindo a hidratação e a entrada de oxigênio dissolvido e causando, em determinados casos, danos irreversíveis que resultam em mortalidade (SLOMAN et al., 2001; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005; GOMES et al., 2008; RAMSAY et al., 2009; PAITAL, 2013). O estresse de exposição aérea provocou elevação da peroxidação lipídica na musculatura branca do lambari *A. altiparanae*, fato que pode ser atribuído à redução de oxigênio difundido pelas brânquias e que afetou negativamente a qualidade do pescado (MARTINEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005; PAITAL, 2013; PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2016).

Uma das alternativas para combater o estresse nos peixes é o uso de anestésicos que, de acordo com a literatura, reduzem a atividade do eixo HPI, responsável pela liberação do hormônio cortisol e da glicose, que estão diretamente relacionados às respostas primárias do estresse. Entretanto, o próprio procedimento de anestesia deve ser estudado em relação ao tempo de exposição, concentração e tipos de agentes anestésicos, pois estes podem ocasionar estresse oxidativo nos organismos (IWAMA; MCGEER; PAWLUK, 1989; SMALL, 2003, PARK et al., 2008; ROSS; ROSS, 2008 VELISEK et al., 2011), além da redução imunológica a patógenos, alterações metabólicas, perda de muco e irritação nas brânquias (SUMMERFELT; SMITH, 1990; BOLASINA, 2006).

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial do anestésico óleo de cravo na mitigação dos efeitos fisiológicos decorrentes do estresse de exposição aérea em juvenis de lambari (*A. altiparanae*).

Determinar a concentração mais adequada e os possíveis efeitos mitigadores do anestésico óleo de cravo, combinado ou não à adição de cloreto de sódio na água, sobre as respostas fisiológicas ao estresse de transporte de juvenis de lambari (*A. altiparanae*).

3. HIPÓTESES

1. A indução anestésica com óleo de cravo modula as respostas fisiológicas ao estresse de exposição aérea em juvenis de lambari (*A. altiparanae*) apresentando, portanto, um efeito mitigador do estresse na espécie.

2. O óleo de cravo mitiga o estresse decorrente do manejo de transporte em juvenis de lambari, havendo um efeito sinérgico nesta resposta em decorrência da sua associação com o cloreto de sódio.

4. JUSTIFICATIVAS

Embora os peixes sejam utilizados em diversas áreas como pesca, aquicultura, ornamentação de ambientes e trabalhos científicos, pouco é estudado e/ou aplicado quanto aos procedimentos éticos e de bem-estar, comparativamente às outras espécies animais. Considerações éticas para evitar o sofrimento dos peixes podem, também, implicar em vantagens comerciais e econômicas, pois mesmo a qualidade da carne é reduzida em animais submetidos a manejos inadequados.

Anestésicos são fármacos que induzem à perda parcial ou completa da percepção dos estímulos, facilitando a manipulação e reduzindo os efeitos do estresse, seja em condições de pesquisa ou nas práticas de manejo inerentes à produção intensiva de peixes. O óleo de cravo é um anestésico natural, de baixo custo e fácil aquisição e

preparo e cujos efeitos, concentrações eficientes e seguras já foram descritas para alevinos de lambari *A. altiparanae* em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Comportamento de Peixes da FZEA/USP sob nossa responsabilidade. Porém, pouca referência foi encontrada sobre seu potencial mitigador das respostas fisiológicas decorrentes do estresse de exposição aérea e do manejo de transporte, situações que podem comprometer o bem-estar e reduzir a produção desta espécie, nativa no Brasil e de reconhecido potencial zootécnico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Avaliação do potencial do óleo de cravo na atenuação das respostas fisiológicas ao estresse decorrente da exposição aérea

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Comportamento de Peixes (LACOPE), Laboratório de Química Biológica (LQB) e Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), com colaboração da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA) - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga (UPD) - Polo Centro Leste da cidade de Pirassununga - SP.

Inicialmente, de um lote de 200 fêmeas de lambaris (*A. altiparanae*), provenientes de desova induzida, com tamanhos próximos e mantidos durante 15 dias em um tanque de 500 L na APTA, foram selecionados 100 peixes que foram acondicionados em embalagens plásticas (cinco animais por litro de água) contendo oxigênio e fechados com tiras de borracha e transportados para o LACOPE onde foram estocados em caixas de 200L para aclimação às condições laboratoriais (15 dias).

Ao finalizar este procedimento, os peixes foram sedados com anestésico óleo de cravo, extraído de folhas de *Eugenia* sp. (1000 mg.L⁻¹) (Viafarma®, São Paulo, Brasil Lote 010742 PM). Este fármaco foi obtido em farmácia de manipulação (Farmácia Homeopática Ouro Preto, Pirassununga, Brasil) e foi diluído na proporção de 20 vezes em álcool PA, de forma a reduzir o seu caráter hidrofóbico e obter-se uma solução estoque alcoólica com a concentração 50 mg.L⁻¹. A seguir, os exemplares foram transferidos individualmente para unidades experimentais onde ficaram durante 30 dias para aclimação às condições laboratoriais (**Figura 4**).

As unidades foram abastecidas por um sistema fechado de circulação de água contendo filtro biológico, sob temperatura controlada em aproximadamente 27°C (Shiruba®, Taichung, Taiwan) e com fotoperíodo de 12 horas artificialmente imposto por meio de lâmpadas fluorescentes acionadas por timer (6:00h às 18:00h). A alimentação consistiu em ração comercial extrusada para lambari (Grupo Ambar Amaral®, Santa Fé

do Sul, Brasil) com pellet de 2 mm e 32% de proteína bruta (PB), oferecida duas vezes ao dia (8:00h e 16:00h), até saciedade aparente.

Figura 4 - Procedimentos de recepção (A), aclimatação (B), anestesia (C), captura (D), seleção (E) e acondicionamento dos peixes nas unidades experimentais (F).

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

A qualidade da água foi monitorada diariamente para registro por meio de equipamentos para leitura da temperatura (Hanna Instruments®, Cluj-Napoca, Romenia), de pH (Extech®, Kaohsiung, Taiwan) e das concentrações de oxigênio (Lutron®, Taipei, Taiwan) e semanalmente, para as concentrações de nitrito e amônia dissolvidos (Hanna Instruments®, Cluj-Napoca, Romenia). Sempre que necessário, os restos de excretas e/ou de alimento foram removidos por sifonamento, substituindo-se aproximadamente 10% da quantidade de água de cada unidade.

Após a aclimação, condição na qual se verificou um padrão normal de alimentação, os peixes foram capturados e anestesiados com óleo de cravo (50 mg.L⁻¹) para realização de todos os procedimentos experimentais, estabelecendo-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de quatro tratamentos com vinte repetições cada, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Delineamento experimental estabelecido para avaliação dos efeitos do anestésico óleo de cravo (50 mg.L⁻¹) sobre as respostas fisiológicas ao estresse em juvenis de lambari (*A. altiparanae*).

Tratamento	Condição experimental
1 Controle/Basal (n = 20 peixes)	Peixes não anestesiados e não estressados
2 Estresse (n = 20 peixes)	Peixes não anestesiados e estressados
3 Anestesia (n = 20 peixes)	Peixes anestesiados e não estressados
4 Anestesia + Estresse (n = 20 peixes)	Peixes anestesiados e estressados

Fonte: Própria autoria

Os peixes do **Tratamento 1** (grupo controle) foram individualmente capturados com rede e submetidos a imersão em água contendo gelo visando ao atordoamento correspondente ao estágio 2 de anestesia profunda (**Tabela 2**), realizando-se coleta de sangue por punção caudal (0,2 mL) com seringas heparinizadas para posterior determinação dos níveis basais dos parâmetros fisiológicos estudados. Uma alíquota de 5 µL foi separada para determinação *in loco* da glicose, por meio de um equipamento portátil (Accu-Chek Active - Roche®, São Paulo, Brasil) e outra de aproximadamente 70 µL foi transferida para tubo capilar e centrifugada para verificação do hematócrito (Hct = % GOLDENFARB et al., 1971) (**Figura 5**).

O restante do sangue coletado foi acondicionado em microtubos e centrifugado durante 15 minutos (3.000 rpm) congelando-se o plasma (-20°C) para determinação do cortisol (EIA - Kit AccuBind®, Lake Forest, EUA) e do lactato (kit enzimático Laborlab®, São Paulo, Brasil), com leituras em microplacas realizadas respectivamente a 450 nm e 540 nm (Multiskan SC - Thermo scientific® Waltham, EUA).

Após a coleta do sangue realizou-se a biometria e os peixes foram mortos por secção medular para remoção do fígado e obtenção de amostras de músculo branco (aproximadamente 2 g por exemplar). O fígado foi pesado para determinação do índice

hepatossomático (IHS = peso do fígado/peso do animal*100) e mantido em nitrogênio líquido para avaliação posterior da concentração de glicogênio. As amostras de músculo branco foram também congeladas realizando-se, posteriormente, a quantificação das concentrações de glicogênio, da peroxidação lipídica (TBA) e da atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), catalase (CAT) e glutatona redutase (GR).

Tabela 2 - Critérios de indução e de recuperação utilizados para determinação da eficácia do óleo de cravo como anestésico em alevinos de lambari (*A. altiparanae*).

Estágios de Indução	Comportamentos Observados
Pré-Indução	Movimentos operculares e de natação normais
1	Aumento pronunciado dos movimentos de natação de um lado para outro, sem perda do equilíbrio.
2	Perda parcial do equilíbrio e natação errática.
3	Anestesia profunda: perda total do equilíbrio, ausência de movimento das nadadeiras e de natação, movimentos operculares reduzidos
4	Anestesia Cirúrgica: ausência de movimentos operculares
Estágios de Recuperação	Comportamentos Observados
1	Aumento dos movimentos operculares e início de movimentação de nadadeiras.
2	Início de natação errática sem estabelecimento de equilíbrio
3	Recuperação parcial do equilíbrio e dos movimentos de natação.
4	Recuperação total do equilíbrio e dos movimentos operculares e de natação

Fonte: Pereira-da-Silva et al., (2009)

Figura 5 - Setas em vermelho coleta de sangue (A), preparação do hematócrito (B) e Leitura (C), setas azuis coleta de sangue (A), para realização de ensaio de cortisol plasmático (D), (E) e (F).

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

As concentrações de glicogênio hepático e muscular (expressas em mg de glicosil-glicose.g de tecido⁻¹) foram determinadas por meio do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956; BIDINOTTO; SOUZA; MORAES, 1997). Amostras de cada um dos tecidos (10 mg de fígado ou 100 mg de músculo branco) foram transferidas para tubos

de ensaio contendo 1 mL de KOH (6,0 N) e incubadas durante dois minutos em banho-maria (100°C) até a total dissolução dos tecidos que foram então transferidos para microtubos contendo 1,5 mL de etanol (95%) e 50 µL de K₂SO₄ (10%) e centrifugados a 4000 rpm (NT-800, Novatecnica®, Piracicaba, Brasil), descartando-se o sobrenadante por inversão. A seguir adicionou-se 1,25 mL de água para suspensão do precipitado e coletou-se 1,0 mL da solução obtida, acrescentando-se 25 µL de solução de fenol 80% e 2,5 mL de ácido sulfúrico PA, homogenizando-se em vórtex a solução resultante que foi então incubada em banho-maria (30°C por 10 minutos), com leituras realizadas a 480 nm em espectrofotômetro (SP22, Bioespectro®, Curitiba, Brasil).

A avaliação da peroxidação lipídica (expressa em mg MDA.kg.tec.úmido⁻¹), cujo princípio básico é a reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído (MDA), principal substância formada durante a oxidação e que reage com o ácido tiobarbitúrico, formando um complexo de coloração rosa, foi realizada pelo método de Vyncke, (1970) adaptado para leitor de microplacas. Inicialmente, a cada amostra de tecido muscular (500mg) contida em microtubos foi adicionado 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA), homogenizando-se em extrator Potter (TE-099, Tecnal®, Piracicaba, Brasil) até a completa dissolução dos tecidos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (CT 14000, Cientec®, Brasil) e 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Merck®, Darmstadt, Alemanha), incubando-se a solução resultante em banho-maria (100°C durante 40 minutos) que foi resfriada em gelo para realização da leitura a 540 nm (Multiskan SC - Thermo scientific® Waltham, EUA) (**Figura 6**).

Figura 6 - Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído (MDA) em amostras de musculatura branca de lambaris.

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Para o ensaio relativo à atividade das enzimas, primeiramente foram realizadas suas extrações, baseadas num processo que consistiu na adição de 1,25 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM) em pH 7,4 às amostras de musculatura branca (500 mg), com homogenização em Potter (TE-099, Tecnal®, Piracicaba, Brasil) seguida de centrifugação por 10 minutos em 10.000 rpm (CT 14000, Cientec®, Belo Horizonte, Brasil) para separação do sobrenadante que foi armazenado em microtubo e mantido em gelo.

Para a determinação da atividade da catalase (CAT), expressa em nmol de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) consumido por minuto por miligrama de proteína ($\text{nmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$), uma alíquota do sobrenadante resfriado (20 μL) foi inserida em uma cubeta de quartzo (1 mL) que continha 980 μL de tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) (Sigma Aldrich®, EUA) a 50 mM e pH 7,0 e H_2O_2 10 mM (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA). Após 30 segundos de redução do H_2O_2 , iniciaram-se as leituras em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA) a 240 nm e temperatura de 25°C (BEERS; SIZER, 1952).

Para avaliação da atividade da enzima glutathiona redutase (GR), expressa em nmol de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína ($\text{nmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{proteína}^{-1}$), uma alíquota do sobrenadante resfriado (40 μL) foi inserida em uma cubeta de quartzo (1mL) contendo 500 μL de tampão fosfato de potássio (K_2PO_4) 200 mM em pH 7,0 (Sigma Aldrich®, EUA), 5 μL de NADPH (0,1 mM) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA), 50 μL de

GSSG (1mM) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) e 405 µL de água ultrapura. Neste ensaio avaliaram-se a oxidação da NADPH e a consequente redução da glutathiona oxidada (GSSG), com leitura durante três minutos a 340 nm em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA) e temperatura de 25°C (CALBERG; MANNERVIC, 1985).

Para determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH), expressa em µmol de NADH oxidado por minuto por miligrama de proteína (µmol.min.mg proteína⁻¹), uma alíquota do sobrenadante resfriado foi previamente diluída na proporção de 50 vezes e após esse procedimento foram coletados 10 µL, inseridos em 990 µL de um meio de ensaio em cubeta de quartzo. A solução de ensaio foi composta de 1 mL de tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) a 200 mM e a pH 7,4, 100 µL de ácido pirúvico a 1 mM (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA), 100 µL de NADH a 0,1 mM (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) e 6,8 mL de água ultrapura. A atividade enzimática foi avaliada por meio da oxidação do NADH lida num intervalo de três minutos a 340 nm em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA) e temperatura de 25°C (BERNT; BERGMEYER, 1974) (**Figura 7**).

Figura 7 - Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA (A) e Tela de análise de enzimas (B).

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

A determinação da quantidade de proteína de cada amostra, necessária para o cálculo da atividade das enzimas avaliadas, foi realizada pelo método de Bradford, (1976), elaborando-se a curva padrão com utilização de soro de albumina bovina com leitura a 595 nm em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA).

Os peixes do **Tratamento 2** foram capturados e submetidos apenas ao estresse de exposição aérea, de acordo com metodologia adaptada de Arends et al. (1999), Luz; Portella (2005) e Costas et al. (2011) (**Figura 8**). Cada peixe permaneceu sob a rede de captura durante cinco minutos e a seguir foi transferido para a unidade experimental de origem, onde permaneceu durante 30 minutos, tempo necessário para a ativação das respostas fisiológicas características da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (BARTON; IWAMA, 1991). Cada indivíduo foi então recapturado e submetido a uma leve sedação com o óleo de cravo (50 mg.L^{-1}) (**Tabela 2**) para realização dos mesmos procedimentos descritos para o grupo controle (Tratamento 1).

Figura 8 - Peixes submetidos à captura (A), e exemplar em estresse de exposição aérea durante 5 minutos (B)

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Os peixes do **Tratamento 3** foram apenas individualmente capturados e anestesiados (anestesia profunda) com óleo de cravo diluído em água na concentração de 50 mg.L^{-1} (cuba de vidro com capacidade para 300 mL), sem prévia exposição aérea (**Figura 9**). A seguir foram transferidos para suas unidades experimentais de origem, onde também permaneceram durante 30 minutos para realização dos procedimentos descritos para o grupo controle, mantendo-se os peixes no estágio de leve sedação com óleo de cravo (**Tabela 2**).

Figura 9 - Peixes submetidos à anestesia (A), e exemplar em anestesia profunda (B)

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Os peixes do **Tratamento 4** foram submetidos à anestesia profunda e a seguir expostos ao ambiente aéreo durante cinco minutos, sendo a seguir transferidos para suas unidades experimentais de origem onde permaneceram durante 30 minutos até realização dos ensaios descritos, também sob efeito de leve sedação com óleo de cravo.

Os dados das variáveis estudadas foram submetidos à ANOVA unidirecional, com posterior comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa computacional Statistical Analysis System SAS (2011).

5.2 Avaliação dos efeitos da adição do óleo de cravo, associado ao cloreto de sódio na água, sobre as respostas fisiológicas ao estresse de transporte em lambaris

O trabalho foi conduzido na Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA) - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga (UPD) - Pólo Centro Leste da cidade de Pirassununga - SP e as posteriores análises no Laboratório de Comportamento de Peixes (LACOPE), Laboratório de Química Biológica (LQB) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP).

Este experimento se iniciou com a preparação da desova induzida para obtenção das larvas, que foram mantidas em tanque de alvenaria por um período de aproximadamente 90 dias para que atingissem o tamanho adequado ao transporte (**Figura 10**).

Figura 10 - Planilha de indução hormonal de lambaris e reagentes (A) e Lambari submetido a injeção intraperitoneal de solução de hipófise para reprodução induzida (B).

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Após este período, foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 (concentrações de NaCl) x 3 (concentrações de óleo de cravo) + 1 (basal), com três repetições e 47 peixes (densidade de 300 gramas de peixe.L⁻¹ de água) em cada tratamento, conforme apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Delineamento experimental estabelecido para avaliação dos efeitos da adição do anestésico óleo de cravo e/ou do cloreto de sódio sobre as respostas fisiológicas ao estresse simulado de transporte (densidade de 300 g.L⁻¹ de peixe) em lambaris (*A. altiparanae*).

	Óleo de Cravo	0mg.L ⁻¹	5, 0mg.L ⁻¹	7, 5mg.L ⁻¹
NaCl	0 g.L ⁻¹	TRAT 1	TRAT 4	TRAT 7
	3,0 g.L ⁻¹	TRAT 2	TRAT 5	TRAT 8
	6,0 g.L ⁻¹	TRAT 3	TRAT 6	TRAT 9

Quantidade total de 1.269 peixes divididos aleatoriamente em nove tratamentos com três repetições cada. Tempo de cinco horas de simulação de transporte. Concentrações de cloreto de sódio e de óleo de cravo baseadas em estudos de Oliveira et al., (2009), e Simões et al., (2012) respectivamente.

Fonte: Própria autoria

O anestésico óleo de cravo, extraído de folhas de *Eugenia* sp. (1000 mg.L⁻¹), obtido em farmácia de manipulação, foi inicialmente diluído (1:20) em álcool etílico absoluto, de forma a reduzir o seu caráter hidrofóbico e obter-se uma solução estoque alcoólica com a concentração 50 mg. L⁻¹. Esta solução foi então diluída em água para obtenção das concentrações 0,0 - 5,0 - 7,5 mg.L⁻¹, correspondentes respectivamente ao controle, 10 e 15% da concentração considerada segura e eficaz para indução à anestesia cirúrgica em alevinos de lambari (50 mg.L⁻¹), em estudos realizados por Pereira-da-Silva et al., (2009). As porcentagens foram também adaptadas de Simões et al., (2012) que avaliaram o efeito do óleo de cravo sobre o estresse decorrente de transporte em juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Para os ensaios de simulação de transporte, foram utilizados 1.269 lambaris com tamanhos próximos a 7 cm, provenientes de desova induzida e estocados (90 dias) num tanque de alvenaria (**Figura 11**).

Figura 11 - Procedimento de despesca dos lambaris obtidos por meio de desova induzida e mantidos em viveiro na Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA - UPD Pirassununga).

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Após a despesca, realizada por meio de rede de arrasto, os peixes foram mantidos durante 24 horas na condição de jejum em tanques localizados no Laboratório da APTA. A seguir os animais, em grupos de 47 indivíduos, foram acondicionados em embalagens plásticas (capacidade para 15 L) preenchidas com 2 L de água onde o anestésico óleo de cravo e/ou o cloreto de sódio foram adicionados nas concentrações estabelecidas para cada tratamento (**Tabela 3**). A densidade de 20 animais por litro de água foi baseada em procedimentos adotados rotineiramente para a prática de transporte dos lambaris na APTA Centro Leste - UPD de Pirassununga.

Cada embalagem foi também preenchida com oxigênio puro até 90% da capacidade total e selada com tiras de borracha, realizando-se a seguir a simulação de transporte que foi caracterizada pela movimentação vertical e horizontal das unidades, dispostas na carroceria de um veículo utilitário, a cada 10 minutos, num período total de cinco horas (**Figura 12**).

Após a simulação do transporte, foram realizadas avaliações da qualidade da água de cada um dos tratamentos (temperatura, pH e concentrações de oxigênio, amônia e de nitrito dissolvidos), anotando-se a eventual taxa de mortalidade dos peixes imediatamente e 96 horas após o procedimento.

Figura 12 - Embalagens de transporte de peixes (A) veículo para simulação de transporte de lambaris *A. altiparanae* (B)

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

A seguir, de cada unidade experimental (embalagem de transporte), foram coletados aleatoriamente cinco peixes, insensibilizados em gelo (**Figura 13**) para realização de biometria e de coleta de sangue (0,2 mL) por punção caudal, utilizando-se seringas previamente heparinizadas.

Figura 13 - Lambaris (*A. altiparanae*) submetidos ao atordoamento em gelo (A) e posterior coleta de sangue por punção caudal (B).

Fonte: Laboratório de Comportamento de Peixes – LACOPE – FZEA – USP

Uma alíquota de 5 μ L foi separada para determinação *in loco* da glicose, por meio de um equipamento portátil (Accu-Chek Active - Roche®, São Paulo, Brasil) e outra de aproximadamente 70 μ L foi transferida para tubo capilar e centrifugada para verificação

do hematócrito (Hct = % GOLDENFARB et al., 1971) (**Figura 5**). O restante do sangue coletado foi acondicionado em microtubos e centrifugado durante 15 minutos (3.000 rpm) congelando-se o plasma (-20°C) para determinação do cortisol (EIA - Kit AccuBind®, Lake Forest, EUA) e do lactato (kit enzimático Laborlab®, São Paulo, Brasil), com leituras em microplacas realizadas respectivamente a 450 nm e 540 nm (Multiskan SC - Thermo scientific® Waltham, EUA).

Após a coleta do sangue realizou-se a biometria e os peixes foram mortos por secção medular para remoção do fígado e obtenção de amostras de músculo branco (aproximadamente 2 g por exemplar). O fígado foi pesado para determinação do índice hepatossomático (IHS = peso do fígado/peso do animal*100) e mantido em nitrogênio líquido para avaliação posterior da concentração de glicogênio. As amostras de músculo branco foram também congeladas para quantificação das concentrações de glicogênio, da peroxidação lipídica (TBA) e da atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), calatase (CAT) e glutathiona redutase (GR).

As concentrações de glicogênio hepático e muscular (expressas em mg de glicosil-glicose.g de tecido⁻¹) foram determinadas por meio do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956; BIDINOTTO; SOUZA; MORAES, 1997). Amostras de cada um dos tecidos (10 mg de fígado ou 100 mg de músculo branco) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de KOH (6,0 N) e incubadas durante dois minutos em banho-maria (100°C) até a total dissolução dos tecidos que foram então transferidos para microtubos contendo 1,5 mL de etanol (95%) e 50 µL de K₂SO₄ (10%) e centrifugados a 4000 rpm (NT-800, Novatecnica®, Piracicaba, Brasil), descartando-se o sobrenadante por inversão. A seguir adicionou-se 1,25 mL de água para suspensão do precipitado e coletou-se 1,0 mL da solução obtida, acrescentando-se 25 µL de solução de fenol 80% e 2,5 mL de ácido sulfúrico PA, homogenizando-se em vórtex a solução resultante que foi então incubada em banho-maria (30°C por 10 minutos) para análise do teor de açúcar redutor total, com leituras realizadas a 480 nm em espectrofotômetro (SP22, Bioespectro®, Curitiba, Brasil).

A avaliação da peroxidação lipídica (expressa em mg MDA.kg.tec.úmido⁻¹), cujo princípio básico é a reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído (MDA), principal substância formada durante a oxidação e que reage com o ácido tiobarbitúrico,

formando um complexo de coloração rosa, foi realizada pelo método de Vyncke, (1970) adaptado para leitor de microplacas. Inicialmente, a cada amostra de tecido muscular (500mg) contida em microtubos foi adicionado 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA), homogenizando-se em extrator Potter (TE-099, Tecnal®, Piracicaba, Brasil) até a completa dissolução dos tecidos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (CT 14000, Cientec®, Brasil) e 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Merck®, Darmstadt, Alemanha), incubando-se a solução resultante em banho-maria (100°C durante 40 minutos) que foi resfriada em gelo para realização da leitura a 540 nm (Multiskan SC - Thermo scientific® Waltham, EUA) (**Figura 6**).

Para o ensaio relativo à atividade das enzimas, primeiramente foi realizada a sua extração, processo que consistiu na adição de 1,25 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM) em pH 7,40 às amostras de musculatura branca (500 mg), com homogenização em Potter (TE-099, Tecnal®, Piracicaba, Brasil) seguida de centrifugação por 10 minutos em 10.000 rpm (CT 14000, Cientec®, Belo Horizonte, Brasil) para separação do sobrenadante que foi armazenado em microtubo e mantido em gelo.

Para a determinação da atividade da catalase (CAT), expressa em nmol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) consumido por minuto por miligrama de proteína (nmol.min.mg proteína⁻¹), uma alíquota do sobrenadante resfriado (20 µL) foi inserida em uma cubeta de quartzo (1 mL) que continha 980 µL de tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄) (Sigma Aldrich®, EUA) a 50 mM e pH 7,0 e H₂O₂ 10 mM (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA). Após 30 segundos de redução do H₂O₂, iniciaram-se as leituras em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA) a 240 nm e temperatura de 25°C (BEERS; SIZER, 1952).

Para avaliação da atividade da glutathiona redutase (GR), expressa em nmol de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína (nmol.min.mg proteína⁻¹), uma alíquota do sobrenadante resfriado (40µL) foi inserida em uma cubeta de quartzo (1 mL) contendo 500 µL de tampão fosfato de potássio (K₂PO₄) 200 mM em pH 7,0 (Sigma Aldrich®, EUA), 5 µL de NADPH (0,1 mM) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA), 50 µL de GSSG (1mM) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) e 405 µL de água ultrapura. Neste ensaio avaliou-se a oxidação da NADPH e consequente redução da glutathiona oxidada (GSSG),

com leitura durante três minutos a 340 nm em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA) e temperatura de 25°C (CALBERG; MANNERVIC, 1985).

Para avaliação da atividade da lactato desidrogenase (LDH), expressa em μmol de NADH oxidado por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{mol}.\text{min}.\text{mg}$ proteína⁻¹), uma alíquota do sobrenadante resfriado foi previamente diluída na proporção de (1:50), e após esse procedimento foram coletados 10 μL , inseridos em 990 μL de um meio de ensaio em cubeta de quartzo. A solução de ensaio foi composta de 1 mL de tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4) (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) a 200 mM e a pH 7,4, 100 μL de ácido pirúvico a 1 mM (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA), 100 μL de NADH a 0,1 mM (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) e 6,8 mL de água ultrapura. A atividade enzimática foi avaliada pela oxidação do NADH lida num intervalo de três minutos a 340 nm em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA) em temperatura de 25°C (BERNT; BERGMEYER, 1974) (**Figura 7**).

A determinação da quantidade de proteína de cada amostra, necessária para o cálculo da atividade das enzimas avaliadas, foi realizada pelo método de Bradford, (1976), elaborando-se a curva padrão com utilização de soro de albumina bovina com leitura a 595 nm em espectrofotômetro (DU-800, Beckman Coulter®, Brea, EUA).

Os dados das variáveis respostas foram submetidos à ANOVA ($p < 0,05$), utilizando-se o Proc GLM do SAS v.9.3 e admitindo-se um delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos em um esquema fatorial 3 a 3 + 1 (basal), ou seja, três níveis (concentrações) do anestésico óleo de cravo (0, 5 e 7,5 $\text{mg}.\text{L}^{-1}$) e três níveis (concentrações) de cloreto de sódio (0, 3 e 6 $\text{g}.\text{L}^{-1}$). As pressuposições da ANOVA foram testadas utilizando-se o SAS/LAB, realizando-se, posteriormente, um estudo de regressão para indicação do melhor grau do polinômio para explicar o comportamento das respostas médias em função do aumento dos níveis dos fatores.

Capítulo 2

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do potencial do óleo de cravo na atenuação das respostas fisiológicas ao estresse decorrente da exposição aérea.

As médias das variáveis relacionadas à qualidade da água, que afetam o metabolismo dos peixes, não diferiram entre os tratamentos e mantiveram-se em valores adequados à manutenção de espécies tropicais (PROENÇA; BITENCOURT, 1994; VINATEA, 2004). Registraram-se médias de $25,17^{\circ}\text{C} \pm 1,28$ para a temperatura, pH $7,51 \pm 0,1$, concentração de oxigênio dissolvido $5,36 \pm 0,32 \text{ mg.L}^{-1}$ e concentrações de amônia e nitrito respectivamente $0,25 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,46 \pm 0,11 \text{ mg.L}^{-1}$, e os pesos dos peixes mantiveram-se semelhantes entre os tratamentos com valores médios de $8,88 \pm 1,85 \text{ g}$.

A coleta de sangue é um procedimento invasivo e potencialmente estressor, pois envolve a captura, a indução anestésica, contenção e exposição dos peixes ao ambiente aéreo, devendo ser realizada em um período inferior a três minutos (COSTAS et al., 2011). No presente estudo, as amostragens de sangue foram realizadas em tempo inferior ao tempo máximo estabelecido na literatura, considerando-se os intervalos entre a captura e o final da punção caudal. Os procedimentos de coleta são necessários para os estudos relacionados aos parâmetros fisiológicos em peixes, entretanto deve-se destacar a dificuldade observada na sua realização, em função do pequeno porte, do reduzido calibre dos vasos sanguíneos e da pouca quantidade de amostra coletada na espécie estudada (EAMES et al., 2010; SHI et al., 2010).

As médias e os respectivos desvios padrão das variáveis estudadas nesta etapa do trabalho, onde os peixes utilizados apresentavam pesos semelhantes, são apresentados na **Tabela 4**.

Nos peixes o estresse pode ser caracterizado por uma série de ajustes ou respostas fisiológicas do organismo, classificadas em primárias, secundárias e terciárias e que permitem o restabelecimento da homeostase (BARTON; IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002; IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006).

Tabela 4 – Respostas fisiológicas da indução anestésica com óleo de cravo (50 mg.L⁻¹) sobre o estresse de exposição aérea durante cinco minutos em juvenis de lambari *A. altiparanae*.

	Controle	Anestesia	Estresse	Anestesia + Estresse
Glicose (mg.dL ⁻¹)	49,91 ± 7,26 ^a	69,9 ± 21,22 ^b	79,56 ± 12,09 ^b	81,00 ± 18,12 ^b
Cortisol (ng.mL ⁻¹)	14,47 ± 7,07 ^a	17,13 ± 7,79 ^a	35,69 ± 18,60 ^b	20,65 ± 6,12 ^a
Hematócrito (%)	26,00 ± 1,78 ^a	27,94 ± 2,11 ^b	28,18 ± 1,98 ^b	25,29 ± 2,20 ^a
Índice hepato somático	1,02 ± 0,24 ^a	1,19 ± 0,31 ^a	1,24 ± 0,29 ^a	1,13 ± 0,27 ^a
Glicogênio hepático (mg.g ⁻¹)	180,3 ± 62,2 ^a	178,93 ± 51,0 ^a	183,65 ± 58,3 ^a	186,5 ± 57,6 ^a
Glicogênio muscular (mg.g ⁻¹)	5,86 ± 1,68 ^a	5,29 ± 1,60 ^a	3,51 ± 1,40 ^b	5,17 ± 2,14 ^a
Lactato (mg dL ⁻¹)	13,68 ± 2,3 ^a	32,07 ± 8,00 ^b	59,47 ± 20,18 ^c	48,5 ± 13,89 ^c
LDH (μmol.min.mg proteína ⁻¹)	9,15 ± 2,18 ^a	8,72 ± 1,95 ^a	8,64 ± 1,14 ^a	8,27 ± 1,20 ^a
GR (nmol.min.mg proteína ⁻¹)	2,33 ± 0,65 ^a	1,59 ± 0,43 ^b	1,65 ± 0,51 ^b	1,66 ± 0,51 ^b
CAT (nmol.min.mg proteína ⁻¹)	2,34 ± 1,38 ^a	1,10 ± 0,35 ^b	1,29 ± 0,38 ^b	1,38 ± 0,61 ^b
Peroxidação lipídica (mg MDA kg tec úmido ⁻¹)	0,20 ± 0,08 ^a	0,21 ± 0,05 ^a	0,29 ± 0,06 ^b	0,28 ± 0,11 ^b

* Médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: própria autoria

As respostas primárias resultam da ativação simpática e imediata liberação de catecolaminas (principalmente a epinefrina, nos teleósteos) pelas células cromafins e a concomitante ativação do eixo hipotálamo-hipófise-células interrenais com a consequente liberação do cortisol pelas células interrenais. Portanto, os níveis de glicose e de cortisol são utilizados rotineiramente como indicadores das respostas dos peixes ao estresse (WEDEMEYER; BARTON; MCLEAY, 1990; BARTON; IWAMA, 1991; MORGAN; IWAMA, 1997; WENDELAAR BONGA, 1997; MOONSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006).

As catecolaminas, liberadas imediatamente após exposição a um agente potencialmente estressor, inibem a gliconeogênese e estimulam a glicogenólise, esta devido à fosforilação da enzima glicogênio fosforilase, situação que provoca aumento dos níveis de glicose no sangue e proporciona o suporte energético ao organismo nas situações de estresse (VIJAYAN; MOON, 1992; WENDELAAR BONGA, 1997). A elevação dos níveis de glicose no sangue pode decorrer de manejos corriqueiros na piscicultura como captura, biometrias, vacinações, limpeza dos tanques e também do transporte (BARTON; IWAMA, 1991; MORGAN; IWAMA, 1997; WENDELLAR BONGA, 1997; BARTON, 2002).

O estresse de exposição ao ambiente aéreo, ferramenta utilizada no presente estudo, ocorre durante o manejo nas condições de criação intensiva, em laboratório ou

mesmo na pesca esportiva (pesque e solte) e apresenta potencial estressor sendo, portanto, um procedimento muito utilizado nas pesquisas para avaliar os efeitos do estresse (SLOMAN et al., 2001; MORALES et al., 2005; GOMES et al., 2008; RAMSAY et al., 2009). Peixes submetidos a esta condição apresentam alterações na osmolaridade, além de redução dos estoques de glicogênio hepático e elevações significativas dos níveis de cortisol, de glicose, de lactato, de proteínas e de triglicerídeos plasmáticos (DALLA VIA et al., 1994; ARENDS et al., 1999; ACERETE et al., 2004; LUZ; PORTELLA, 2005; COSTAS et al., 2011).

Observou-se neste estudo que tanto a anestesia de forma isolada quanto a exposição aérea, combinada ou não à prévia anestesia com óleo de cravo, provocaram um aumento médio de 53,9% na glicose sanguínea dos peixes (**Figura 14**).

Figura 14 - Quantificação de glicose sanguínea (mg.dL^{-1}) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse.

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa ($P < 0,05$)
 Fonte: própria autoria.

Porém, os níveis de cortisol apresentaram elevação apenas nos peixes submetidos à exposição ao ambiente aéreo (146,6%), sugerindo que o aumento da glicemia em todos os tratamentos tenha decorrido da atividade de catecolaminas, liberadas nos primeiros minutos após a manipulação dos peixes, e que o óleo de cravo, mitigou as respostas ao estresse agudo no lambari (**Figura 15**).

Figura 15 - Quantificação de cortisol plasmático (ng.mL⁻¹) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse.

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa ($P < 0,05$)

Fonte: própria autoria.

Uma das funções do cortisol é mobilizar substratos energéticos (glicose) para suprir a demanda metabólica possibilitando o reabastecimento dos estoques energéticos em situações de estresse (MOOMSEN et al., 1999; BARTON; MORGAN; VIJAYAN, 2002; IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006; VIJAYAN; ALURU; LEATHERLAND, 2010). Seu aumento ocorre mais tardiamente, alguns minutos após a liberação das catecolaminas e, de modo geral, com picos de concentração observados entre 30 minutos e uma hora após a exposição ao agente estressor (MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; BARTON, 2002; BARTON; MORGAN; VIJAYAN, 2002; IWAMA; AFONSO; MATHILAKATH, 2004). Foram registrados picos de cortisol 30 minutos após o estresse em *Pseudoplatystoma corruscans* e entre 30 minutos a 1 hora para o *R. quelen* (BARCELLOS et al., 2001; LIMA et al., 2006; FAGUNDES; URBINATI, 2008). Em exemplares de *Sparus aurata* L foi observado aumento da glicose e do cortisol após exposição aérea de três minutos, e para espécie *Perca fluviatilis* L elevação do cortisol após apenas um minuto de exposição a este agente estressor (ARENDS et al., 1999; ACERETE et al., 2004).

As respostas secundárias ao estresse decorrem da liberação das catecolaminas e do cortisol, que provocam alterações osmo-regulatórias e do metabolismo energético, e as respostas terciárias se devem à exposição dos peixes aos agentes estressores

intensos ou repetidos, que impossibilitam o restabelecimento da homeostase, comprometem o desempenho, reduzem a resistência a doenças ou qualquer agente estressor adicional e resultam em mortalidade (BARTON; IWAMA, 1991; PICKERING, 1993; WEDEMEYER, 1996; WENDELAAR BONGA, 1997; REID; VIJAYAN; PERRY, 1996; REID; BERNIER; PERRY, 1998; MOONSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; CONTE, 2004; IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006).

De modo geral, a indução anestésica é considerada benéfica por facilitar o manejo e reduzir a atividade locomotora, o estímulo visual, o consumo de oxigênio e a excreção de amônia, além de reduzir ou inibir a ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-interrenal com a consequente redução da liberação do cortisol e de glicose no sangue (IWAMA; MCGEER; PAWLUK, 1989; SMALL, 2003). Porém, o próprio agente anestésico pode ser considerado um agente estressor, pois pode provocar alterações metabólicas (efeitos colaterais) detectadas horas após a realização dos procedimentos (SUMMERFELT; SMITH, 1990; BOLASINA, 2006). Peixes expostos por longos períodos aos anestésicos podem sofrer estresse que é expresso pela elevação da glicose e cortisol (IWAMA; MCGEER; PAWLUK, 1989; THOMAS; ROBERTSON, 1991; BARTON, 1997; ORTUÑO; ESTEBAN; MESEQUER, 2002). Na espécie *Solea senegalensis* foram observados aumento do cortisol e da glicose e lactato após exposição de 24 horas ao 2-fenoxietanol (WEBER et al., 2011). Entretanto, para a espécie *Dicentrarchus labrax* (L.) expostas ao mesmo anestésico e ao eugenol, não foram registradas alterações significativas de cortisol, glicose e hematócrito (FILICIOTTO et al., 2012).

A elevação do hematócrito é uma resposta secundária ao estresse causada pela atividade do cortisol sobre os tecidos hematopoiéticos e tem como consequência o aumento da capacidade de transporte do oxigênio no sangue (EVANS; CLAIRBORNE, 2005). Matrinxãs *B. amazonicus*, submetidos a estresse de captura durante 10 minutos não apresentaram esta resposta, sugerindo que este parâmetro não seja de muita sensibilidade e que necessite de maior investigação, ou que a espécie seja resistente a este tipo de estresse (HOSHIBA; GONÇALVES; URBINATI, 2009). Exemplares de *Dicentrarchus labrax* expostos ao eugenol, não apresentaram alterações significativas deste parâmetro, entretanto na pirapitinga *Piaractus brachypomus* foi observado aumento do hematócrito, sugerindo efeito estressor do uso deste anestésico para a espécie

(SLADKY et al., 2001; FILICIOTTO et al., 2012). No presente estudo observou-se que tanto a exposição aérea como a indução anestésica, de forma isolada, promoveram um aumento do hematócrito, evidenciando o potencial estressor destes procedimentos para o lambari. Porém, a prévia anestesia com o óleo de cravo inibiu neste experimento, esta resposta nos peixes que expostos ao ambiente aéreo (**Figura 16**).

Figura 16 - Quantificação do Hematócrito (%) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse.

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa ($P < 0,05$)
 Fonte: própria autoria.

O glicogênio é o principal substrato energético que se encontra armazenado em maiores quantidades nos tecidos hepático e muscular dos peixes, atendendo às maiores demandas impostas nas condições de estresse (LEHNINGER, 1971; SOENGAS; ALBEGUNDE; ANDRÉS, 1995; MORAES; OLIVEIRA; RANTIN, 1996; BIDINOTTO; SOUZA; MORAES, 1997; WENDELAAR BONGA, 1997; ROACH, 2002). A maior parte da glicose contida nos hepatócitos dos teleósteos é convertida em glicogênio (PEREIRA et al., 1995), cuja concentração varia entre 20 e 2000 $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ (MOON; FOSTER, 1995). A quantidade deste substrato no fígado é refletida pelo Índice Hepatossomático (IHS), utilizado como um indicador geral de sanidade e que retrata a demanda metabólica de energia e alterações em curto prazo da condição nutricional dos peixes (EVERAARTS, 1993; ALMEIDA; MELETI; MERTINEZ, 2005).

Em condições de estresse as catecolaminas, liberadas imediatamente, promovem a fosforilação da enzima glicogênio fosforilase, resultando no aumento da glicogenólise e, conseqüentemente, dos níveis de glicose sanguínea (VIJAYAN; MOON, 1992). A posterior elevação do cortisol estimula processos catabólicos para liberar aminoácidos e ácidos graxos livres que possibilitam a produção da glicose (via gliconeogênese), cuja maior parte é estocada na forma de glicogênio hepático e muscular, compensando o débito inicial causado pela resposta ao estresse (VIJAYAN et al., 1994; MOOMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999).

Desde que o piruvato esteja disponível, a energia proveniente da quebra da glicose pode ser obtida tanto por processos aeróbios quanto anaeróbios e, nos peixes submetidos a um exercício extenuante, observa-se um aumento pronunciado da glicólise anaeróbia muscular (WOOD; PERRY, 1985; MILLIGAN; WOOD, 1986; DOBSON; HOCHACHKA, 1987). O estresse pode também provocar aumento da atividade locomotora dos peixes, com conseqüente mobilização de energia proveniente da glicólise anaeróbia e rápida elevação das concentrações musculares de lactato e de íons H^+ (MILLIGAN; GIRARD, 1993). Portanto, o lactato caracteriza-se também como um importante indicador fisiológico para avaliação do estresse nos peixes (VIJAYAN et al., 1997; GOMES et al., 2006).

A redução do IHS reflete a mobilização de reservas hepáticas de glicogênio em decorrência do estresse (WENDELAAR BONGA, 1997), que ocorre com maior dificuldade, comparativamente à do glicogênio muscular (JANSSENS; LOWREY, 1987; LERMEN et al., 2004). Embora lambaris submetidos a exposição aérea durante cinco minutos tenham apresentado redução do IHS (PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2016), não foram observadas neste estudo alterações desta variável ou mesmo das reservas de glicogênio hepático nos peixes submetidos aos diferentes tratamentos (**Tabela 4**). Por outro lado, as reservas musculares de glicogênio reduziram significativamente (40,1%) após a exposição ao ambiente aéreo (**Figura 17**), corroborando com esta hipótese. Por outro lado, a prévia anestesia com o óleo de cravo evitou a mobilização do glicogênio muscular nos peixes que foram expostos ao ambiente aéreo, sugerindo um efeito modulador/mitigador deste anestésico sobre as respostas ao estresse no lambari.

Figura 17 - Quantificação do Glicogênio muscular (mg.g^{-1}) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa ($P < 0,05$)

Fonte: própria autoria.

Foi registrada uma redução do glicogênio muscular acompanhada pelo aumento dos níveis de lactato em exemplares de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidos à hipóxia durante seis horas, o que indicou a ocorrência de padrões anaeróbios de ajustes fisiológicos dos peixes (MORAES et al., 1997). Neste trabalho observou-se que a indução anestésica com óleo de cravo e a exposição aérea também causaram aumento do lactato plasmático (**Figura 18**) sugerindo, portanto, a mudança do metabolismo aeróbio para o anaeróbio nos lambaris submetidos ao estresse agudo.

Neste estudo, a elevação do lactato foi mais pronunciada (294,6%) entre os peixes submetidos à exposição aérea e, considerando que o exercício extenuante é um tipo de agente estressor que causa a elevação dos níveis de cortisol, redução das reservas de glicogênio muscular e aumento do lactato no sangue (PAGNOTTA; BROOKS; MILLIGAN, 1994; EROS; MILLIGAN, 1996), pode-se inferir que esta resposta tenha decorrido do aumento da atividade dos peixes que permaneceram sob a rede de captura (tentativa de escape), durante a exposição ao ambiente aéreo, situação que causou aumento da glicólise anaeróbia nos músculos (MILLIGAN; WOOD, 1986; DOBSON; HOCHACHKA, 1987).

Figura 18 - Quantificação do lactato (mg.dL^{-1}) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse.

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa ($P < 0,05$)
Fonte: própria autoria.

A glicólise anaeróbia é uma via metabólica que proporciona a alguns peixes a habilidade de produzir natações bruscas e repentinas, sendo a lactato desidrogenase (LDH) a enzima terminal desta reação e que catalisa a redução do piruvato em lactato pela NADH, gerando NAD^+ (BRIGHTMAN et al., 1997). O aumento da atividade da LDH, relacionada à formação de ácido láctico durante o metabolismo anaeróbio, expressa uma resposta secundária ao agente estressor e a elevação de seus níveis na corrente sanguínea sugere a ocorrência de danos celulares ou teciduais (HENDERSON, 1986; WENDELAAR BONGA, 1997).

Neste estudo, não se observou alteração na atividade da LDH na musculatura branca dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos (**Tabela 4**). Resultado semelhante foi observado em tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas ao estresse de confinamento, em ambiente de coloração azul (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2012) ou expostas ao cádmio (ALMEIDA et al., 2001). Entretanto, foi observado aumento da atividade da LDH na musculatura branca e de modo mais acentuado na vermelha, em tilápias submetidas a um estresse de contenção durante 90 minutos (GIRAO; PEREIRA-DA-SILVA; MELO, 2012).

O oxigênio molecular é importante para a manutenção dos processos metabólicos nos organismos aeróbios, mas a produção contínua de ATP mitocondrial provoca a

formação de subprodutos como O_2^- , H_2O_2 e $\cdot OH$, que são denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (STOREY, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). As EROs provocam danos às proteínas, membranas e DNA e, portanto, os organismos necessitam de sistemas enzimáticos e não enzimáticos de proteção (defesas antioxidantes), que podem prevenir sua formação, inativá-las por meio da combinação com enzimas antioxidantes ou reparar consequente danos celulares (ADAMS; GREELEY; RYON, 2000). Estes sistemas foram descritos em peixes que, assim como os demais organismos aeróbios, são susceptíveis aos efeitos deletérios das EROs (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005), podendo-se destacar as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP_x), glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT), além de sequestradores de baixo peso molecular como a glutathione (DROGE, 2002; STOREY, 1996).

A exposição ao ambiente aéreo, ferramenta muito utilizada nas pesquisas para avaliação dos efeitos e da resistência dos peixes ao estresse (SLOMAN et al., 2001; MORALES et al., 2005; GOMES et al., 2008; RAMSAY et al., 2009), provoca a privação do fluxo de água, desidratação e redução do suprimento de oxigênio através das brânquias, o que compromete a homeostase energética e provoca o estresse oxidativo, com consequentes danos teciduais irreversíveis (STOREY, 1996; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; YONAR; SAKIN, 2011; PAITAL, 2013). Segundo Velisek et al. (2011), até mesmo um agente anestésico pode provocar alterações características do estresse oxidativo.

A CAT facilita a remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é transformado em água e oxigênio molecular, e a redução da sua atividade está correlacionada à presença de agentes estressores, que causam a elevação da concentração de radicais superóxidos (TONI et al., 2010; YONAR; SAKIN, 2011). Esta enzima pode ser considerada um biomarcador de estresse oxidativo, pois atua nos tecidos e órgãos como a primeira linha de defesa antioxidante (PANDEY et al., 2003; ATLI; CANLI, 2007). Exemplares da espécie *Heteropneustes fossilis* submetidos a estresse de exposição aérea apresentaram redução na atividade da CAT, indicando diminuição do potencial redox no tecido muscular (PAITAL, 2014). Esta redução também foi observada no fígado e lamelas branquiais da carpa comum *C. carpio* quando submetida à exposição

subcrônica aos organofosforados atrasina e clorpirifós (XING et al., 2012). Por outro lado, foi observada elevação da atividade desta enzima nos músculos branco e vermelho de exemplares de tilápia-do-nilo, *O. niloticus*, submetidos ao estresse de confinamento, efeito que foi revertido nos peixes que receberam previamente ração suplementada com licopeno (GIRAO; PEREIRA-DA-SILVA; MELO, 2012).

Observou-se no presente estudo que tanto a indução à anestesia com óleo de cravo quanto a exposição aérea, de forma isolada ou combinada, provocaram a redução da atividade das enzimas antioxidantes CAT (46,1%) (**figura 19**).

Figura 19 - Atividade da enzima catalase expressa em (nmol.min.mg proteína⁻¹) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse.

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa (P<0,05)
Fonte: própria autoria.

A glutathiona redutase é a enzima responsável pela recuperação da Glutathiona Reduzida (GSH), possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da Glutathiona e, portanto, do equilíbrio dos sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos (BARBOSA et al., 2010). Exemplares de *Heteropneustes fossilis* submetidos a estresse de exposição aérea apresentaram também redução da atividade desta enzima no músculo e cérebro, indicando redução do potencial redox do tecido (PAITAL, 2013; 2014). Resultados semelhantes foram também observados em tecido hepático e branquial da carpa comum *C. carpio* após exposição a organofosforados (XING et al., 2012). Por outro lado, um aumento na atividade da GR foi observado em exemplares *Sparus aurata*

submetidos a privação de alimento, caracterizando aumento do estresse oxidativo (PASCUAL et al., 2003).

Na tilápia-do-nylo *O. niloticus* observou-se elevação da atividade da GR tanto na musculatura branco como na vermelha, após estresse de confinamento, resposta que foi revertida pela inclusão de licopeno na dieta (GIRAO; PEREIRA-DA-SILVA; MELO, 2012). Observou-se neste estudo uma redução média de 30,3% na atividade da GR em todos os tratamentos (**Figura 20**).

Figura 20 - Atividade da enzima glutathiona redutase expressa em (nmol.min.mg proteína⁻¹) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse.

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa ($P < 0,05$)
Fonte: própria autoria.

As EROs como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), quando em grande quantidade, podem reagir com macromoléculas biológicas susceptíveis e causar danos ao DNA, oxidar proteínas, e lipídios, o que caracteriza a peroxidação lipídica, considerada uma das causas da redução da qualidade da carne e seus subprodutos (MIN; AHN, 2005; SHI et al., 2005; VINAGRE et al., 2012). Os organismos aquáticos possuem uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados, comparados aos demais animais, e, portanto, o teste de TBARS, ensaio que quantifica a proporção de malondialdeído (MDA), subproduto da

decomposição de hidroperóxidos dos ácidos graxos poliinsaturados, pode ser utilizado para avaliar o estresse oxidativo (HUANG et al., 2003; OSAWA, et al., 2005).

No presente trabalho, o anestésico óleo de cravo não causou aumento da peroxidação lipídica, ao contrário do que foi observado entre os peixes submetidos ao estresse de exposição aérea, nos quais a elevação foi de 45% (**Figura 21**). De fato, o aumento das EROs e do estresse oxidativo são respostas que decorrem da redução do suprimento de água e, portanto, de oxigênio através das brânquias e comprometimento da homeostase energética em peixes submetidos à exposição aérea (MARTINEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005; PAITAL, 2013).

Figura 21 - Quantificação da peroxidação lipídica TBA (mg MDA kg tec úmido⁻¹) em lambaris *A. altiparanae* submetido anestesia, estresse e anestesia e estresse.

A+E = combinação estresse e anestesia * = diferença significativa (P<0,05)
Fonte: própria autoria.

O aumento da peroxidação lipídica também foi observado em musculatura e cérebro de *Heteropneustes fossilis* após exposição aérea (PAITAL, 2013; 2014) e em musculatura branca de *C. carpio* após exposição aos organofosforados (XING et al., 2012). O uso do óleo essencial de *Aloysia triphylla* como anestésico, durante o transporte, promoveu a estabilidade oxidativa de filés congelados de jundiás (*R. quelen*), e evitou a peroxidação lipídica, consequentemente aumentando o tempo de prateleira do pescado (DANIEL et al., 2016). No presente estudo, o anestésico óleo de cravo não evitou o aumento da peroxidação lipídica causado pela exposição dos peixes ao ambiente aéreo,

entretanto, seu uso de forma isolada também não contribuiu para esta resposta, sugerindo a viabilidade de sua utilização no manejo do lambari.

Capítulo 3

6.2 Avaliação dos efeitos da adição do óleo de cravo, associado ao cloreto de sódio na água, sobre as respostas fisiológicas ao estresse de transporte em lambaris.

Os dados das variáveis indicadoras da qualidade da água registrados nesta fase são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Tabela descritiva dos valores médios (n=3) das variáveis indicadoras da qualidade de água registrados após transporte simulado de lambaris (*A. altiparanae*) na densidade de 300g.L⁻¹.

Tratamentos	pH	OD mg.L ⁻¹	Temperatura °C	Amônia mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Cond. ms.cm ⁻¹
Basal	6,6 ± 0,8	7,6 ± 0,4	26,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,06 ± 0,004	0,08 ± 0,01
Controle	6,1 ± 0,3	6,3 ± 0,7	25,6 ± 0,9	9,4 ± 3,3	0,07 ± 0,003	0,26 ± 0,11
3S0OC	6,1 ± 0,4	6,3 ± 0,5	25,8 ± 0,4	12,7 ± 4,6	0,08 ± 0,009	5,45 ± 0,17
6S0OC	6,0 ± 0,3	5,8 ± 0,8	25,9 ± 0,6	17,2 ± 3,4	0,13 ± 0,006	10,40 ± 0,83
0S50C	6,2 ± 0,4	6,1 ± 0,8	26,4 ± 0,6	8,0 ± 0,2	0,04 ± 0,009	0,26 ± 0,01
3S50C	6,1 ± 0,6	5,6 ± 0,3	26,7 ± 0,6	8,5 ± 2,7	0,10 ± 0,003	5,06 ± 0,11
6S50C	5,8 ± 0,1	4,9 ± 0,3	26,8 ± 0,5	10,2 ± 2,9	0,04 ± 0,002	9,99 ± 0,28
0S7,50C	6,2 ± 0,4	5,9 ± 0,2	27,0 ± 0,2	8,7 ± 2,5	0,09 ± 0,010	0,25 ± 0,05
3S7,50C	6,0 ± 0,5	4,8 ± 0,2	27,0 ± 0,2	6,5 ± 2,6	0,08 ± 0,004	5,60 ± 0,61
6S7,50C	5,9 ± 0,3	5,2 ± 0,2	27,2 ± 0,6	9,8 ± 2,4	0,12 ± 0,037	10,29 ± 0,57
Média geral	6,1 ± 0,4	5,8 ± 0,6	26,7 ± 0,5	9,2 ± 2,5	0,08 ± 0,025	4,76 ± 0,27

Fonte: própria autoria. *OD = oxigênio dissolvido, Cond = Condutividade, S= sal, OC= óleo de cravo

Durante o transporte simulado, a temperatura mínima da água foi de 25,6°C ± 0,9 e a máxima 27,2° C ± 0,6 e o pH permaneceu entre 6,6 ± 0,8 e 5,8 ± 0,1 não havendo diferença entre os tratamentos para estas duas variáveis. Observou-se que o nitrito se manteve em valores entre 0,01 ± 0,001 e 0,04 ± 0,001 mg.L⁻¹ e que houve redução significativa e semelhante das concentrações de oxigênio dissolvido em todos os tratamentos, comparativamente aos valores registrados para a água do tanque de estocagem dos peixes (7,6 ± 0,4 mg.L⁻¹), com valor mínimo de 4,80 ± 0,2 mg.L⁻¹. É importante destacar que apesar das oscilações observadas, estas variáveis mantiveram-se em valores adequados à manutenção de espécies de peixes tropicais (PROENÇA; BITENCOURT, 1994; VINATEA, 2004).

A amônia resulta do catabolismo de proteínas provenientes da dieta fornecida aos peixes, sendo o mecanismo principal de sua eliminação o fluxo passivo através das brânquias (BOYD, 1996; HURVITZ; BERCOVIER; RIJN, 1997). Para híbridos de tilápia

vermelha (*O. niloticus* × *O. mossambicus*) determinaram-se valores de DL50 para a amônia de 6,6, 4,0 e 2,6 mg.L⁻¹, após 24, 48 e 96 horas de exposição (DAUD et al., 1988).

Embora concentrações de amônia superiores a 0,5 mg L⁻¹ sejam consideradas prejudiciais à sanidade dos peixes (GOLOMBIESKI et al., 2005), valores superiores (0,7 mg.L⁻¹) foram registrados durante o transporte simulado do curimbatá *Prochilodus lineatus* na densidade de 250 g.L⁻¹ e durante 6 horas, sem mortalidade (GONÇALVES et al., 2010). Em tilápias *O. niloticus* registraram-se 3,6 mg.L⁻¹ de amônia para alevinos e 2,6 mg.L⁻¹ para juvenis, após transporte durante cinco horas, também sem mortalidade (OLIVEIRA et al., 2009). Considerando que uma das formas de reduzir a excreção de amônia é a imposição de restrição alimentar (GROTTUM; STAURNES; SIGHOLT, 1997), um período de jejum de 24 horas foi imposto aos peixes neste estudo, previamente ao transporte. Apesar disso, foram registrados valores elevados da amônia que oscilaram entre 0,6 ± 0,1 e 17,2 ± 3,4 mg.L⁻¹, porém sem mortalidade durante e após o período de 5 horas de transporte simulado em uma densidade de 300 g.L⁻¹ de peixe.

Os valores de condutividade elétrica da água podem ser utilizados para avaliar a quantidade de matéria orgânica liberada na forma de excretas ou restos de alimento não consumido pelos peixes (ITUASSU et al., 2004). Este parâmetro também pode ser utilizado como um indicador do estresse de transporte, uma vez que nesta condição ocorre a liberação de íons sódio e potássio durante a tentativa de osmorregulação, resultando em um desequilíbrio eletrolítico que, em casos extremos, pode resultar em mortalidade (WENDELAAR BONGA, 1997). Os valores aceitáveis da condutividade para o cultivo de peixes encontram-se entre 0,06 a 0,5 ms.cm⁻¹, e são alterados pela alta densidade e consequente aumento da liberação de amônia e íons durante o transporte (ITUASSU et al., 2004; GOMES et al., 2008). Na arraia cururu *Potamotrygon* cf. *histrrix*, espécie de água doce, houve aumento da condutividade após 24 horas de transporte (BRINN et al., 2012) e no transporte simulado de *Pimelodus maculatus* a condutividade também aumentou a partir de 4 horas (BRAUN; NUÑER, 2014). No presente estudo a condutividade permaneceu em valores considerados aceitáveis, entretanto a adição do cloreto de sódio nas proporções de 3 e 6 g.L⁻¹, resultaram na elevação significativa desta variável, com valores entre 5,06 ± 0,11 e 10,40 ± 0,83 ms.cm⁻¹, porém sem mortalidade.

As médias, erros padrões e coeficientes de variação dos dados das demais variáveis respostas estudadas são apresentados na **Tabela 6**. Os peixes utilizados apresentaram pesos similares ($15,7 \pm 0,3$ g), não havendo diferença entre os tratamentos ($p = 0,2638$) e nenhuma mortalidade foi observada durante ou 96 horas após a condução dos ensaios de transporte simulado.

A concentração de glicose no sangue aumenta em decorrência de manejos como a captura, biometrias ou vacinações, limpeza dos tanques e o transporte, entre outros, caracterizando a “resposta primária ao estresse agudo” que proporciona suporte energético para restabelecimento da homeostase dos peixes (BARTON; IWAMA, 1991; WENDELLAR BONGA, 1997; BARTON, 2002). Esta elevação decorre inicialmente da atividade das catecolaminas, que promovem a fosforilação da enzima glicogênio fosforilase, resultando no aumento da glicogenólise e, conseqüentemente, dos níveis de glicose, de modo a atender ao aumento da demanda energética nas condições de estresse (VIJAYAN; MOON, 1992). O cortisol é liberado posteriormente e sua função é manter a resposta inicial, na medida em que mobiliza substratos energéticos, geralmente a glicose, para atender à maior demanda metabólica e permitir o reabastecimento dos estoques de energia nas situações de estresse (BARTON; MORGAN; VIJAYAN, 2002; IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006; VIJAYAN; ALURU; LEATHERLAND, 2010). Neste estudo, observou-se que a glicose já se apresentava elevada nos peixes provenientes do tanque de estocagem (basal), comparativamente aos padrões basais estabelecidos para a espécie em laboratório, sugerindo-se efeito do manejo e/ou das interações sociais (SCHRECK, 1981). Uma vez que a coleta de sangue é um procedimento estressante para os peixes e deve ocorrer em até três minutos (COSTAS et al., 2011), poderíamos atribuir esta elevada glicemia à manipulação. Porém, as coletas foram realizadas em tempo inferior a este limite, o que minimizou e padronizou para os tratamentos os possíveis efeitos do procedimento sobre as variáveis estudadas.

Tabela 6 Valores médios ($\pm$ erros padrões) dos pesos e das variáveis fisiológicas registradas para as diferentes combinações dos níveis de NaCl (0, 3 e 6 g.L⁻¹) e de óleo de cravo (0, 5 e 7,5 mg.L⁻¹) antes (basal) e após transporte simulado (5 h) em lambaris *A. altiparanae*.

Óleo (mg.L ⁻¹)		0				5				7,5				Média Geral	CV (%)
Sal (g.L ⁻¹)	Basal	0	3	6	Média	0	3	6	Média	0	3	6	Média		
Pesos (g)	16,7 $\pm$ 0,9	17,0 $\pm$ 0,9	15,5 $\pm$ 0,9	15,3 $\pm$ 0,9	15,9 $\pm$ 0,6	15,1 $\pm$ 0,9	15,5 $\pm$ 0,9	15,9 $\pm$ 0,9	15,8 $\pm$ 0,6	13,8 $\pm$ 0,9	15,4 $\pm$ 0,9	15,3 $\pm$ 0,9	14,8 $\pm$ 0,6	15,7 $\pm$ 0,3	23,7
Glicose (mg.dL ⁻¹)	92,6 $\pm$ 9,0	99,5 $\pm$ 8,8	106,9 $\pm$ 8,7	100,1 $\pm$ 8,7	102,2 $\pm$ 5,1	104,6 $\pm$ 8,7	101,7 $\pm$ 8,7	98,0 $\pm$ 8,7	101,4 $\pm$ 5,1	124,5 $\pm$ 9,4	77,1 $\pm$ 8,7	92,5 $\pm$ 8,7	98,1 $\pm$ 5,2	99,8 $\pm$ 2,8	34,1
Cortisol (ng.mL ⁻¹)	38,6 $\pm$ 2,9	36,5 $\pm$ 2,9	37,4 $\pm$ 3,2	34,1 $\pm$ 3,1	36,0 $\pm$ 1,8	33,6 $\pm$ 3,1	34,3 $\pm$ 3,3	31,4 $\pm$ 3,1	33,1 $\pm$ 1,8	30,5 $\pm$ 3,2	28,0 $\pm$ 3,1	29,4 $\pm$ 3,1	26,0 $\pm$ 1,8	32,4 $\pm$ 1,0	33,2
Hematócrito (%)	39,7 $\pm$ 1,6	41,9 $\pm$ 1,5	39,2 $\pm$ 1,5	38,1 $\pm$ 1,5	39,7 $\pm$ 0,9	39,0 $\pm$ 1,5	41,7 $\pm$ 1,5	40,4 $\pm$ 1,5	40,4 $\pm$ 0,9	39,5 $\pm$ 1,5	38,5 $\pm$ 1,5	42,1 $\pm$ 1,5	40,0 $\pm$ 0,9	40,0 $\pm$ 0,5	14,4
ÍHS (%)	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,03	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,03	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,03	0,8 $\pm$ 0,02	25,6
Glicogênio Hepático (mg.g ⁻¹)	19,8 $\pm$ 6,1	23,8 $\pm$ 5,9	26,7 $\pm$ 5,9	32,0 $\pm$ 5,9	27,5 $\pm$ 3,4	18,4 $\pm$ 5,9	30,6 $\pm$ 5,9	36,0 $\pm$ 5,9	28,3 $\pm$ 3,4	23,7 $\pm$ 6,1	22,3 $\pm$ 6,1	35,7 $\pm$ 5,9	27,2 $\pm$ 3,4	26,9 $\pm$ 1,9	24,7
Glicogênio Muscular (mg.g ⁻¹)	6,5 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,6	6,9 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,6	6,8 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,6	7,4 $\pm$ 0,6	7,9 $\pm$ 0,6	7,4 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,2	33,4
Lactato (mg dL ⁻¹)	39,1 $\pm$ 5,8	56,5 $\pm$ 5,8	44,2 $\pm$ 5,8	25,3 $\pm$ 5,8	41,9 $\pm$ 3,3	46,2 $\pm$ 6,0	40,1 $\pm$ 6,0	40,1 $\pm$ 6,0	42,4 $\pm$ 3,4	52,7 $\pm$ 5,8	51,6 $\pm$ 6,0	33,1 $\pm$ 6,2	45,8 $\pm$ 3,4	46,5 $\pm$ 2,3	51,9
Peroxidação Lipídica (mg MDA.kg tecido.úmido ⁻¹)	0,26 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,02	40,8
LDH (μ mol.min. mg proteína ⁻¹)	6,6 $\pm$ 0,3	7,9 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,1	13,2
CAT (nmol.min. mg proteína ⁻¹)	2,0 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	52,1
GR (nmol.min. mg proteína ⁻¹)	1,2 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,03	23,0

Fonte: Própria autoria

Peixes submetidos ao estresse apresentam aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade das brânquias, devido à atividade das catecolaminas que facilitam as trocas gasosas. Além disso, apresentam alteração na permeabilidade do tegumento, com consequente perda de eletrólitos, como sódio e o cloro, e influxo de água, o que caracteriza uma perturbação osmorregulatória e eletrolítica (WEDEMEYER; BARTON; MCLEAY, 1990; MCDONALD; MILLIGAN, 1997). A adição de cloreto de sódio na água de transporte de peixes é uma prática comum na piscicultura e visa à redução dos efeitos deste manejo com potencial estressor, uma vez que eleva a salinidade a níveis similares aos sanguíneos, reduzindo o gradiente iônico e a difusão de íons dos peixes para a água (GOMES et al., 2003; URBINATI; CARNEIRO, 2006).

Observou-se, neste estudo, um efeito linear ($p = 0,0358$) na redução da concentração de glicose nos peixes submetidos ao transporte em água contendo concentrações crescentes de óleo de cravo (taxa de 3,5 unidades de glicose/unidade de anestésico) na presença de NaCl (3 g.L^{-1}). Um efeito quadrático ($p = 0,0013$) na redução da glicose foi também observado entre os peixes que foram transportados em água contendo concentrações crescentes de NaCl na presença de óleo de cravo ($7,5 \text{ mg.L}^{-1}$), com máxima atividade para a concentração estimada de $3,8 \text{ g}$ de NaCl. (Figura 22).

Figura 22 - Quantificação de glicose sanguínea (mg.dL^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}).

Fonte: Própria autoria

Os níveis de cortisol podem também aumentar durante a indução anestésica, em decorrência da hiperatividade inicial dos peixes e, portanto, um anestésico eficaz deve provocar a rápida sedação de modo a suprimir este efeito (BARTON; IWAMA, 1991). A anestesia com óleo de cravo provocou aumento dos níveis de cortisol em pirapitinga *Piaractus brachypomus* (SLADKY et al., 2001) e “steelhead truta” *O. mykiss*. (PIRHONEN; SCHRECK, 2003). Porém, observou-se neste estudo que tanto as adições de sal, como a de óleo de cravo na água, provocaram a redução linear dos níveis de cortisol plasmático dos peixes, com um efeito mais significativo para o anestésico ($p = 0,0008$), comparativamente ao sal ($p = 0,0429$), sem efeito da interação entre os fatores (sal e óleo) ($p = 0,0640$) (**Figura 23**).

Figura 23 - Quantificação de cortisol plasmático (ng.mL^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}) ou de óleo de cravo (mg.L^{-1}).

Fonte: Própria autoria

O Índice Hepatossomático (IHS) pode refletir a quantidade de glicogênio armazenado no fígado e é utilizado como um indicador geral de sanidade, retratando a demanda metabólica de energia e alterações em curto prazo da condição nutricional dos peixes (EVERAARTS, 1993; ALMEIDA; MELETI; MERTINEZ, 2005). Porém, neste estudo não foram evidenciados efeitos da adição do óleo de cravo ou do sal na água de transporte sobre esta variável ($p = 0,8719$).

A elevação do hematócrito é uma resposta secundária ao estresse causada pela atividade do cortisol sobre os tecidos hematopoiéticos e tem como consequência o aumento da capacidade de transporte do oxigênio no sangue (EVANS;

CLAIRBORNE, 2005). Para a espécie matrinxã (*B. amazonicus*) submetidos a estresse de captura durante 10 minutos não foi observada esta resposta e os autores sugerem que esta variável não apresenta sensibilidade ou que a espécie é resistente a este tipo de estresse (HOSHIBA; GONÇALVES; URBINTATI, 2009). Exemplos da espécie *Dicentrarchus labrax* expostos ao eugenol não apresentaram alterações significativas do HTC, entretanto para a pirapitinga *Piaractus brachipomus* foi observado elevação dos valores, indicando que o anestésico causou estresse nesta espécie (SLADKY et al., 2001; FILICIOTTO et al., 2012). No presente estudo também não foram evidenciados efeitos da adição do óleo de cravo ou do sal na água de transporte sobre esta variável ($p = 0,8372$).

A redução do glicogênio hepático e muscular, assim como o aumento do lactato e ocorrência de alterações osmóticas e imunológicas do sangue são efeitos do estresse secundário (MAZEAUD; MAZEAUD; DONALDSON, 1977; EDDY, 1981; BARTON, 2002). A redução do glicogênio hepático foi observada em exemplares da espécie *B. amazonicus* submetidos a banhos anestésicos com eugenol (BARBOSA; MORAES; INOUE, 2007) e em peixes da espécie *R. quelen* submetidos ao transporte de 6 horas com o anestésico *Aloysia triphylla* (ZEPPENFELD et al., 2014). Porém, neste estudo, não se observaram efeitos da presença do óleo de cravo sobre esta variável ($p = 0,9040$) (**Tabela 6**).

Entre as alternativas de redução do estresse podemos citar o sal, opção viável e de fácil aquisição, que é adicionado na água durante o transporte de várias espécies (BARTON; PETER, 1982; CARNEIRO; URBINATI, 2001; GOMES et al., 2003b; OLIVEIRA et al., 2009). O sal atua na redução do gradiente osmótico entre o plasma e o meio externo contribuindo para a manutenção da homeostase em situação de estresse (MAZIC; SIMCO; PARKER, 1991; WURTS, 1995). Na espécie matrinxã *B. cephalus* foi observada redução nos estoques de glicogênio hepático nos peixes que foram transportados em água sem adição de sal (URBINATI; CARNEIRO, 2006), resultado semelhante ao observado para tilápias *O. mossambicus* submetidas a estresse de confinamento (VIJAYAN et al., 1997). No presente estudo a adição de concentrações crescentes de sal na água evitou a depleção dos estoques deste substrato causada pelo estresse de transporte nos peixes, observando-se um aumento linear ($p = 0,0155$) de 2,1 unidades de glicogênio para cada unidade de sal acrescida (**Figura 24**).

Figura 24 - Quantificação de glicogênio hepático (mg.g^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}).

Fonte: Própria autoria

A redução do glicogênio muscular também é considerada uma resposta secundária do estresse (DALLA VIA et al., 1994; BARTON, 2002). Entretanto, não foram observadas alterações desta variável na espécie *R. quelen* após adição do anestésico *Aloysia triphylla* na água de transporte realizado durante 6 horas (ZEPPENFELD et al., 2014) bem como na espécie *B. amazonicus* após banhos anestésicos com eugenol (BARBOSA; MORAES; INOUE, 2007). Porém, observou-se redução dos estoques de glicogênio muscular no pacu *P. mesopotamicus* após estresse de hipóxia (MORAES et al., 1997) e em *Paralichthys olivaceus* mantidos em diferentes densidades de estocagem durante o transporte (SHIM; YOON, 2014). No presente trabalho, maiores concentrações de glicogênio muscular foram registradas nos tratamentos onde o óleo de cravo foi utilizado, observando-se um efeito linear ($p = 0,0101$) com aumento de 0,19 unidades/unidade de anestésico acrescido (**Figura 25**). O mesmo efeito, porém, numa função quadrática e de modo menos pronunciado, foi observado para o sal, sem efeito da interação entre o anestésico e o sal ($p = 0,4406$).

Figura 25 - Quantificação de glicogênio muscular (mg.g^{-1}) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}) ou de óleo de cravo (mg.L^{-1}).

Fonte: Própria autoria

O lactato é um importante indicador fisiológico para avaliação do estresse nos peixes, pois apresenta rápida elevação na circulação decorrente da hidrólise do glicogênio que, por sua vez, resulta do aumento da atividade muscular dos peixes (MILLIGAN; GIRARD, 1993; VIJAYAN et al., 1997; GOMES et al., 2006). Neste estudo, o óleo de cravo não provocou alterações nos níveis de lactato, entretanto foi observada elevação deste substrato em exemplares da espécie *B. amazonicus* submetidos à anestesia com eugenol (BARBOSA; MORAES; INOUE, 2007). Este aumento foi também observado em tambaquis *C. macropomum* anestesiados com óleo de cravo (INOUE et al., 2011). Entretanto, para a espécie *R. quelen*, foi relatada redução do lactato após transporte de 6 horas em água contendo o anestésico *Aloysisia triphylla*. (ZEPPENFELD et al., 2014).

Além do uso do anestésico, outra forma de redução do estresse e, consequentemente, do lactato, é a adição de sal na água de transporte que contribui para a manutenção da homeostase e aumenta a produção de muco, protegendo os peixes de lesões durante captura (BARTON; PETER, 1982; MAZIC; SIMCO; PARKER, 1991; WURTS, 1995 CARNEIRO; URBINATI, 2001; GOMES et al., 2003b; OLIVEIRA et al., 2009). A ausência do sal resultou no aumento de lactato em trutas *Onchorhynchus mykiss* transportadas durante 3 horas e 30 minutos (SHABANI et al.,

2016) ou submetidas a exercícios natatórios durante 2 horas (MILLIGAN; WOOD, 1986). Para a espécie *Paralichthys olivaceus* também foi observado efeito semelhante em exemplares submetidos ao transporte em diferentes densidades de estocagem (SHIN; YOON, 2014). No presente estudo o sal proporcionou a redução dos níveis de lactato plasmático, com efeito linear ($p = 0,0002$) numa taxa de 2,46 unidades/g de sal acrescido, comprovando seus efeitos na redução do estresse no lambari (**Figura 26**).

Figura 26 - Quantificação de lactato plasmático (mg.dL⁻¹) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L⁻¹).

Fonte: Própria autoria

O aumento da taxa de peroxidação lipídica é geralmente uma resposta imediata à produção das EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) e esta é também utilizada para avaliação da toxicidade de produtos químicos nos peixes (ORUC; SEVGILER; UNER, 2004). A peroxidação lipídica é decorrente do estresse oxidativo e pode ser determinada por meio do ensaio de TBARs, cujo princípio baseia-se na análise da reação colorimétrica do ácido tiobarbitúrico, com o malondialdeído (VINCKE, 1970; SOUTHHORN; POWIS, 1988; STOREY, 1996; HUANG et al., 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; MODESTO; MARTINEZ, 2010; VELISEK et al., 2011). Para a espécie *Rhamdia quelen* a peroxidação lipídica foi reduzida no tecido muscular e hepático de peixes submetidos ao transporte de 6 horas sob anestesia com *A. triphylla* (ZEPPENFELD et al., 2014). Para a mesma espécie, o uso *Lippia alba* durante o transporte de 6 horas não evitou a peroxidação lipídica no fígado (SALBEGO et al.,

2014) mas a utilização de *A. triphylla* contribuiu na promoção da estabilidade oxidativa dos filés congelados (DANIEL et al., 2016).

A peroxidação lipídica apresentou elevação após estresse de contenção em tilápias *O. niloticus*, entretanto o uso do antioxidante licopeno reduziu os valores deste substrato (GIRAO; PEREIRA-DA-SILVA; MELO, 2012). No presente estudo peixes transportados em água contendo o anestésico óleo de cravo não apresentaram elevação da taxa de peroxidação lipídica do músculo branco, sugerindo um efeito atenuador das respostas fisiológicas ao estresse na espécie. Por outro lado, observou-se aumento desta resposta nos peixes que foram transportados com água acrescida de sal, com efeito quadrático ($p = 0,0029$) evidenciado a partir do valor estimado de 1,6 g deste produto (**Figura 27**).

O aumento da peroxidação lipídica no músculo dos lambaris pode ser atribuído a uma resposta imediata da produção das EROs provavelmente pela situação de estresse dos peixes durante o transporte (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Resultados semelhantes ao do presente trabalho foram relatados para *B. cephalus* expostos a organofosforados, e para *A. bimaculatus* expostos ao alumínio (MONTEIRO et al., 2006; VIEIRA; CORREIA; MOREIRA, 2013). O sal é descrito como uma substância que regula a homeostase e protege o corpo do peixe, auxiliando na produção de muco, entretanto sua administração na água de transporte é feita de forma aleatória pelos produtores (MAZIC; SIMCO; PARKER, 1991; WURTS, 1995; GOMES et al., 2003b). O produto é amplamente utilizado na tentativa de redução do estresse durante o transporte, porém sendo observados efeitos positivos e negativos desta prática (CARNEIRO; URBINATI 2001; SALARO et al., 2015). Para alevinos da espécie *A. altiparanae* o sal, na concentração de até 6 g.L⁻¹, não causou mortalidade e reduziu os efeitos do estresse durante o transporte, entretanto concentrações de 12 e 15 g.L⁻¹ provocaram respectivamente 50 e 100% de mortalidade num período de 3 horas de contínua exposição (SALARO et al., 2015).

Figura 27 - Quantificação de peroxidação lipídica (mg.MDA.kg tecido.úmido⁻¹) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L⁻¹).

Fonte: Própria autoria

A lactato desidrogenase (LDH), também denominada desidrogenase láctica, é uma enzima terminal da glicólise anaeróbia, responsável pela conversão do ácido láctico muscular em ácido pirúvico, etapa importante na produção de energia pela célula. O aumento da sua atividade expressa uma resposta secundária ao agente estressor e a elevação de seus níveis na corrente sanguínea é um indicador de danos celulares e ou teciduais (HENDERSON, 1986; WENDELAAR BONGA, 1997). Peixes submetidos ao transporte apresentam elevação da atividade da LDH devido ao aumento de processos catabólicos relacionados à presença do cortisol e devido a danos ao fígado e tecidos musculares (PAKHIRA et al., 2015).

Observou-se neste estudo uma redução linear ($p = 0,0114$) na atividade da LDH entre os peixes que foram tratados com concentrações crescentes de sal, com redução de 0,26 unidades/grama de sal acrescido. Embora na primeira etapa deste projeto a atividade da LDH não tenha sido alterada após a indução anestésica com o óleo de cravo, observou-se durante o transporte simulado uma interação entre o sal e o anestésico, com efeito quadrático ($p = 0,0034$) na redução da atividade enzimática para concentrações crescentes de sal na presença de anestésico óleo de cravo (5 e 7,5 mg.L⁻¹), com máxima resposta na concentração estimada de 2,9 g de sal.L⁻¹ (Figura 28).

Figura 28 - Quantificação de atividade da enzima lactato desidrogenase ($\mu\text{mol}.\text{min}.\text{mg}$ proteína⁻¹) em função das concentrações crescentes de NaCl ($\text{g}.\text{L}^{-1}$) e interação com as concentrações de óleo de cravo (0, 5, e 7,5 $\text{mg}.\text{L}^{-1}$).

Fonte: Própria autoria

O estresse de confinamento aumentou a atividade da LDH na musculatura vermelha e branca na tilápia *O. niloticus* (GIRAO; PEREIRA-DA-SILVA; MELO, 2012), entretanto não foram observadas alterações na atividade desta enzima em peixes da mesma espécie expostos a metais pesados (ALMEIDA et al., 2001). A permanência dos peixes sob o espectro de luz azul enquanto submetidos a um estresse de confinamento manteve sua atividade na musculatura branca (semelhante aos níveis basais) e aumentou na musculatura vermelha (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2012). Peixes da espécie *Clarias batrachus* submetidos à hipóxia apresentaram aumento da atividade da LDH nas brânquias e fígado, entretanto sem alterações para o tecido muscular (TRIPATHI et al., 2013). O aumento da atividade desta enzima pode ser atribuído também à susceptibilidade do órgão ao estresse e sua contribuição relativa na manutenção da homeostase, uma vez que foi observada elevação mais acentuada da LDH no cérebro e no coração, comparativamente à musculatura, em peixes da espécie *Barbus neumayeri* submetidos à hipóxia (MARTINEZ et al., 2011).

A CAT facilita a remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é transformado em água e oxigênio molecular, e a redução da sua atividade está correlacionada à presença de agentes estressores, que causam a elevação da concentração de radicais superóxidos (TONI et al., 2010; YONAR; SAKIN, 2011). Esta enzima atua nos

órgãos e tecidos como primeira linha de defesa antioxidante, sendo, portanto, considerada como um biomarcador de estresse oxidativo (PANDEY et al., 2003; ATLI; CANLI, 2007).

Observou-se elevação da atividade da CAT nas brânquias após 3 horas e no músculo e plasma após 6 horas de hipóxia, sem alterações para o fígado, em peixes da espécie *Clarias batrachus* (TRIPATHI et al., 2013). Esta resposta foi também observada na musculatura branca e vermelha da tilápia *O. niloticus*, após estresse de confinamento (GIRAO; PEREIRA-DA-SILVA; MELO, 2012) e na espécie *Barbus barbus* após exposição durante 10 minutos aos anestésicos óleo de cravo, MS-222, 2-fenoxietanol e propiscina (PRIBORSKY et al. 2015). A elevação da atividade da CAT foi também observada na primeira fase deste estudo nos peixes apenas submetidos à indução anestésica com o óleo de cravo, embora não tenha sido evidenciado aumento da peroxidação lipídica do músculo branco nesta condição.

Exemplares da espécie *R. quelen* submetidos ao transporte de 6 horas com o anestésico *A. triphylla* apresentaram redução da atividade da CAT no rim e elevação nas brânquias (ZEPPENFELD et al., 2014). Esta redução foi também observada no tecido muscular, em exemplares da espécie *Heteropneustes fossilis* submetidos a exposição aérea (PAITAL, 2014), assim como no tecido hepático e branquial de carpas *C. carpio* expostas a organofosforados (XING et al., 2012). Neste estudo, registrou-se redução linear ($p = 0,0071$) na atividade da CAT durante o transporte simulado e com a adição do anestésico na água, numa taxa de 0,11 unidades/mg de anestésico acrescido (**Figura 29**). Porém, não foram observados efeitos do sal ($p = 0,3553$) ou da interação deste com o anestésico ($p = 0,3354$).

Figura 29 - Quantificação da atividade da enzima catalase (nmol.min.mg proteína⁻¹) em função das concentrações de óleo de cravo (mg.L⁻¹).

Fonte: Própria autoria

A GR é responsável pela recuperação da glutathiona reduzida (GSH), possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutathiona e, portanto, do equilíbrio dos sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos (BARBOSA et al., 2010). O estresse oxidativo foi caracterizado pela elevação da atividade desta enzima no tecido hepático de exemplares da espécie *Sparus aurata* submetidos restrição alimentar (2% da biomassa) durante um período de 46 dias (PASCUAL et al., 2003). O estresse de confinamento também provocou a elevação da sua atividade na musculatura branca e vermelha de exemplares de tilápia *O. niloticus*, efeito que foi revertido pela adição do antioxidante licopeno na dieta (GIRAO; PEREIRA-DA-SILVA; MELO, 2012). Por outro lado, a exposição aérea de exemplares de *Heteropneustes fossilis* causou redução da atividade da GR no cérebro e tecido muscular (PAITAL, 2013; 2014), resposta também observada no fígado e brânquias da carpa comum *C. carpio* após exposição a organofosforados (XING et al., 2012). Não foram observadas alterações na atividade desta enzima nos tecidos hepático, muscular, branquial e cerebral de exemplares de *Barbus barbus* após exposição durante 10 minutos a banhos anestésicos com óleo de cravo, MS-222, 2-fenoxietanol e propiscina (PRIBORSKY et al., 2015).

No presente estudo, o sal ou o anestésico de forma isolada e em suas diferentes concentrações não alteraram a atividade da GR, porém observou-se

interação entre estes produtos ($p = 0,0290$), com efeito quadrático ($p = 0,0103$) na elevação da atividade enzimática em função da adição de concentrações crescentes de sal na água que continha $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ do anestésico, com atividade estimada a partir de $0,7 \text{ g de sal. L}^{-1}$. Um efeito quadrático ($p = 0,0115$) no aumento da atividade da GR nos peixes transportados com concentrações crescentes do anestésico na água que continha 6 g sal.L^{-1} foi também observado, com atividade estimada a partir de $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ **(Figura 30)**.

Figura 30 - Quantificação da atividade da enzima glutatona redutase ($\text{nmol.min.mg proteína}^{-1}$) em função das concentrações crescentes de NaCl (g.L^{-1}) ou óleo de cravo (mg.L^{-1}).

Fonte: Própria autoria

7. CONCLUSÕES

1) A exposição aérea e o transporte caracterizam-se como potentes agentes estressores para o lambari, provocando alterações que comprometem seu status fisiológico e, portanto, o bem-estar e a qualidade do pescado;

2) O anestésico óleo de cravo na concentração 50 mg.L⁻¹, modula e mitiga as respostas fisiológicas ao estresse de exposição aérea e inibe a liberação do cortisol e contribui para a preservação dos estoques de glicogênio muscular;

3) A anestesia com óleo de cravo na concentração 50 mg.L⁻¹ não provoca a peroxidação lipídica, porém não evita esta resposta causada pela exposição aérea no lambari;

4) O óleo de cravo e o NaCl nas concentrações 5 e 7,5 mg.L⁻¹ e 3 a 6 g.L⁻¹, respectivamente, isolados ou associados na água de transporte, são seguros e atenuam os efeitos negativos do estresse decorrente deste procedimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMORAD, E. G.; CASTELLANI, D. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari-do-rabo-amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, p.31-38, 2011.
- ACERETE, L. et al. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004
- ADAMS, S. M.; GREELEY Jr, M. S.; RYON, M.G. Evaluating effects of contaminants on fish health at multiple levels of biological organization. Extrapolation from lower to higher levels. **Human Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v.6, p.15-27, 2000.
- ALMEIDA, J. D. et al. Environmental cadmium exposure and metabolic response of tilapia do nilo. **Environmental pollution**, v.114, pp.169-175, 2001.
- ALMEIDA, J. S.; MELETI, P. C.; MERTINEZ, C. B. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.140, p.356-363, 2005.
- ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, v.17, p.301-307, 1997.
- ANDRADE, D. R. et al. Ciclo reprodutivo anual de lambaris *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) em viveiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 435-347, 1985
- ANDRIAN, I. F.; SILVA, H. B. R.; PERETTI, D. Dieta de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), da área de influência do reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.23, p.435-440, 2001.
- ARENDS, R. J. et al. The stress response of the gilthead sea-bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. **Journal of Endocrinology**, v.163, p.149-157, 1999.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C v.145, pp.282–287, 2007
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.
- BARBOSA, L. M.; MORAES, G.; INOUE, L.A.K.A. Metabolic responses of matrinxã to eugenol in anesthetic baths. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.29, p.255-260, 2007.

- BARTON, B. A. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. In: IWAMA, G. K. et al. (Eds.), **Fish Stress and Health in Aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series**, v. 62, p.1-33, 1997.
- BARTON, B. A.; IWANA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 10, p.3-26 1991.
- BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish, p. 111–148. In Adams SM (ed.) **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 2002.
- BARTON, B. A.; PETER, R. E. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock. **Journal of Fish Biology**, v.20, 39-51, 1982.
- BARTON, B. A. Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p. 517-525, 2002.
- BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.
- BERKA, R. **The transport of live fish**. A review. EIFAC tech.Pap. 1986 (48):52 p.
- BERNT, E.; BERGMAYER H. U. Lactate dehydrogenase assay. In: BERGMAYER, H.U. (Ed.), **Methods of Enzymatic Analysis**, London: Academic Press, p.141-147, 1974.
- BIDINOTTO, P. M.; SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do Cepta**, v.10, p.53-60, 1997.
- BOLASINA, S. N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. **Aquaculture International**, v.14, p.569-575, 2006.
- BRAUN, N.; NUÑER, A.P.O. Stress in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) at different densities and times in a simulated transport. **Zoologia**, v.31, p.101-104, 2014.
- BRIGHTMAN, R. I. et al. Energetics of larval red drum, *Sciaenops ocellatus*.Part II. Growth and biochemical indicators. **Fishery Bulletin**, v.95, p.431-444, 1997.
- BRINN, R. P. et al. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.162, p.139-145, 2012.

CALBERG, I.; MANNERVICK, B. **Glutathione Reductase. Methods in Enzymology**. Academic Press, New York, NY, USA, p.484-490, 1985.

CARMICHEL, G. J.; TOMASSO, J. R.; SCHWEDLER, T. E. **Fish transportation**. In: WEDEMEYER, G. A. (Ed.). *Fish hatchery management*. 2nd ed. Bethesda: American Fisheries Society, 2001, p. 641-660.

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

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

CHANDEL, N. S.; SHUMACKER, P. T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. **Journal of Applied Physiology**, v.88, p.1880-1889, 2000.

CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behavioural Science** v.86, p.205-223, 2004.

CORREA, S. A. et al. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.1725-1731, 2003.

COSTAS, B. et al. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. **Aquaculture**, v.316, p.68-76, 2011.

DALLA VIA, J. et al. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of Solea. II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. **Marine Ecology Progress Serie**, v.111, p.17-27, 1994.

DANIEL, A. P. et al. Oxidative stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of Aloysia triphylla during transport. **Ciência Rural**, v.46, p.560-566, 2016.

DAUD, S. K.; HASBOLLAH, D.; LAW, A. T. Effects of unionized ammonia on red tilapia (*Oreochromis mossambicus*/ *O. niloticus* hybrid) fry. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 2. 1988, [S.L.]. **Proceedings...** [S.L.]: ICLARM, 1988, p.411-413.

DELANEY, M. A.; KLESIOUS, P. H. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v.236 p.633-644, 2004.

DOBSON, G. P.; HOCHACHKA, P. W. Role of glycolysis in adenylate depletion and repletion during work and recovery in teleost white muscle. **Journal of Experimental Zoology**, v.129, p.125-140, 1987.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v.82, p.47-95, 2002.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-358, 1956.

EAMES, S.C. et al. Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. **Zebrafish**, v.7, p.205-213, 2010.

ENDO, T. et al. Studies on the anesthetic effect of eugenol in some fresh water fishes. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.38, p.761-767, 1972.

EROS, S.; MILLIGAN, G. L. The effect of cortisol on recovery from exhaustive exercise in rainbow trout: potential mechanisms of action. **Physiological Zoology**, v.69, p.1196-1214, 1996.

EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. **The physiology of fishes**, Taylor & Francis Group, New York, USA, 2005, 601p.

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H. Effects of sublethal dissolved oxygen stress on blood glucose and susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.15, p. 202-208, 2003.

EVERAARTS, J. M. Biological markers in fish: DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index. **Marine Environmental Research**, v.35, p.101-107, 1993.

FÁVARO, T. Lambari ganha mercado, na pesca e na mesa: de isca viva a petisco, peixe deixa de ser praga em tanques para se tornar fonte de renda. São Paulo: **Suplemento Agrícola do Estadão**, 15 de maio de 2002.

FRANCIS-FLOYD, R. **Stress: Its role in fish disease**. University of Florida IFAS Extension Circular 919, University of Florida, Gainesville, 2002.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu Ciência e Tecnologia, Série Zoologia**, v.13, p.65-88, 2000.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Editora UNESP. 2003, 332p.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. J. GÉRY (Ed), T. F. H. Publications, New Jersey, 1977, 672p.

- GIRAO, P. M. PEREIRA-DA-SILVA, E. M. MELO, M. P. Dietary lycopene supplementation on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles submitted to confinement: effects on cortisol level and antioxidant response. **Aquaculture Research**, v.43, p.789-798, 2012.
- GOLDENFARB, P. B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.35-39, 1971.
- GOLOMBIESKI, J. I. et al. Qualidade da água no consórcio de peixes com arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1263-1268, 2005.
- GOMES, L. C. et al. Avaliação do efeito do sal e densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.283-290, 2003a.
- GOMES, L. C. et al. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 34, n. 1, p. 76-84, 2003.
- GOMES, L.C. et al. Transport of pirarucu *Arapaima gigas* juveniles in plastic bag. **Acta Amazonica**, v.33 p.631-636, 2003b.
- GOMES, L. C. et al. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v.256, p.521-528, 2006.
- GOMES, L. C. et al. Using Efinol ®-L during transportation of marbled hatchetfish, *Carnegiella strigata* (Günther). **Aquaculture Research**, v. 39, p.1292-1298, 2008
- GONÇALVES A. F. N. et al. Transporte de juvenis de curimatá *Prochilodus lineatus* em diferentes densidades. **Acta Scientiarum**. v 32, p.205-211, 2010.
- GROTTUM, J. A.; STAURNES, M.; SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. **Aquaculture Research**, v.28, n.2, p.159-164, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.
- HARMON, S.T. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. **Reviews in Aquaculture**, v.1, 58-66, 2009.
- HAYASHI, C. et al. Frequência de Arraçoamento para Alevinos de Lambari do Rabo-Amarelo (*Astyanax bimaculatus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.1, p.21-26, 2004.
- HENDERSON A. R. Isoenzymes of lactate dehydrogenase in: **Methods of Enzymatic Analysis** Vol. III (Third Edition) (Ed.) H.U. Bergmeyer, VCH, USA and Canadá, 1986, 138 p.

HERBERT, N. A.; STEFFENSEN, E. J. F. The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. **Marine Biology**, v.147, p.1403-1412, 2005.

HIKASA, Y. et al. Anaesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.48, p.341-351, 1986.

HOSHIBA, M. A.; GONCALVES, F. D.; URBINTATI, E. C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazonica**. v.39, n.2, p. 445-451, 2009

HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. 1996. The nature of hematological response in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.15, p.339-347, 1996.

HUANG, C. H. et al. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Comparative Biochemistry and Physiology (B)**, v.134, p. 265-270, 2003.

HURVITZ, A.; BERCOVIER, H.; RIJN, J. V. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 7, p. 45-53, 1997.

ITUASSU, D. R. et al. Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1199-1203, 2004.

IWAMA, G. K.; ACKERMAN, P. A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. **Biochemistry and molecular biology of fishes**. New York: Elsevier, 1994.v.3, p.1-15.

IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B.; MATHILAKATH. V. Stress in fish. In: **Aquanet Workshop on Fish Welfare**, Campbell River, B.C., Canada, and September 27, 2004, p.1-9.

IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B.; VIJAYAN, M. M. Stress in fish. In: EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. (Ed.) **The Physiology of fishes**, p.319-342. Taylor and Francis, 3rd edition. 601 p. USA, 2006.

IWAMA G. K.; MCGEER, J.; PAWLUK, M. P. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v.67, p.2065-2073, 1989.

IWAMA, G. K. Stress in fish. **Annals of the New York Academy of Science**, v.851, p. 304-310, 1997.

JANSSENS, P. A.; LOWREY, P. Hormonal regulation of hepatic glycogenolysis in the carp, *Cyprinus carpio*. **American Journal of Physiology**, v.252, p.653-660, 1987.

JENSEN, C.; LAURIDSEN, C.; BERTELSEN, G. Dietary Vitamin E: Quality and Storage Stability of Pork and Poultry. **Trends in Food Science and technology**, v.9, p.62-72, 1998.

KAVALCO K.F. et al. Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *Bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.134, p.108-119, 2011.

LENINGHER, A. L. Carboidratos: Estrutura e Função Biológica. In: **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Ed. Savier, 1971.

LERMEN, C. L. et al. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.239, p.497-507, 2004.

LOBÓN-CERVIÁ, J.; BENNEMANN, S. Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in rio Tibagi (Paraná, Southern Brazil). **Archiv für Hydrobiologie**, Stuttgart, v. 149, n. 2, p. 285-306, 2000.

LUZ, R. K.; PORTELLA, M. C. Tolerance to the air exposition test of *Hoplias lacerdae* larvae and juvenile during its initial development. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.567-573, 2005.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.15, p.75-88, 2005.

MARTINEZ, M. L. et al. Oxygen limitation and tissue metabolic potential of the African fish *Barbus neumayeri*: roles of native habitat and acclimatization. **BMC Ecology**, v. 11, p.2-9, 2011.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.106, p.201-212, 1977.

MAZIC, P. M.; SIMCO, B. A.; PARKER, N. C. Influence of water hardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.120, p.121-126. 1991.

MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: **Fish Stress and Health in Aquaculture** (Ed. BY IWAMA, G. W. et al.), p. 119 -144. University.Press, Cambridge. 1997.

MILLIGAN C. L.; GIRARD S. S. Lactate metabolism in rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v.180, p.175-193, 1993.

MILLIGAN, C. L.; WOOD, C. M. Tissue intracellular acid-base status and the fate of lactate after exhaustive exercise in the rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, v.123, p.123-144, 1986.

- MIN, B., AHN, D. U. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products – A review. **Food Science and Biotechnology**, v.14, p.152-163, 2005.
- MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v.78 p. 294-299, 2010.
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p.211-268, 1999.
- MOON, T. W.; FOSTER, G. D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: HOCHACHKA, P. W. MOONSEN, T. O. (Ed.), **Biochemistry and molecular biology of fish, Metabolic Biochemistry**, v.4. Elsevier Sciences Publishers, New York, p.65-100, 1995.
- MORAES, G. et al. Immediate changes on metabolic parameters of the freshwater teleost fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu) under severe hypoxia. **Boletim Técnico do CEPTA**, v.10, p.45-52, 1997.
- MORAES, G.; OLIVEIRA, M. C.; RANTIN, F. T. The metabolic pattern changes of *Hoplias malabaricus* from normoxia to hypoxia conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, v.56, p.191-196, 1996.
- MORALES, A. E. et al. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, v.36, p.33-40, 2005.
- MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G. W. et al. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p.247-270, 1997.
- MOYLE, P. B.; CECH, Jr, J. J. **Fishes: An introduction to ichthyology**. 2ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. 1998. 559p.
- NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v.4, p.2393-2400, 1992.
- NUNES, M. L.; BATISTA, I.; CARDOSO C. **Aplicação do Índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado**. Lisboa: IPIMAR, 2007. 51 p.
- O'CONNOR, E. A.; POTTINGER, T. G.; SNEDDON, L. U. The effects of acute and chronic hypoxia on cortisol, glucose and lactate concentrations in different populations of three-spined stickleback. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.37, p. 461-469, 2011.

OLIVEIRA, J. R. et al. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p.1163-1169, 2009.

ORSI, M.L. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000, (Teleostei, Characidae) da bacia do rio Paranapanema (Baixo rio Tibagi). 2001. (Dissertação) **Mestrado** - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *A. altiparanae* Garutti e Britski (Teleostei, Characidae) do médio Paranapanema, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.21, p.207-218, 2004.

ORUC, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.137, p.43-51, 2004.

OSAWA, C. C. et al. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, p. 655-663, 2005.

PAGNOTTA, A.; BROOKS, L.; MILLIGAN, L. The potential regulatory roles of cortisol in recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v.72, p.2136-2146, 1994.

PAITAL, B. Antioxidant and oxidative stress parameters in brain of *Heteropneustes fossilis* under air exposure condition; role of mitochondrial electron transport chain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.95, p.69-77, 2013.

PAITAL, B. Modulation of redox regulatory molecules and electron transport chain activity in muscle of air breathing fish *Heteropneustes fossilis* under air exposure stress. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, v.184, p.65-76, 2014.

PAKHIRA, C. et al. Stress responses in rohu, *Labeo rohita* transported at different densities. **Aquaculture Reports**, v.2, p.39-45, 2015.

PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Science of the Total Environment**, v.309, pp. 105-115, 2003.

PARK, M. O. et al. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v.39, p.877-884, 2008.

PASCUAL, P. et al. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). **Chemico- Biological Interactions**, v.145, p.191-199, 2003.

PAULA, C. Efeito do eugenol na sobrevivência de lambaris (*Astyanax* sp.) em diferentes concentrações e temperaturas. 2009. (Dissertação) **Mestrado** - Tecnologia em Aquicultura Continental, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009.

PEREIRA, C. et al. Role of glucose and insulin in regulating glycogen synthase and phosphorylase activities in rainbow trout hepatocytes. **Journal of Comparative Physiology**, v. 165, p.62-70, 1995.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M. et al. Atividade da catalase e da lactato desidrogenase em tilápias submetidas a estresse de confinamento: efeito da cor do ambiente. **Ciência Rural**, v.42, p.894-899, 2012.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M. et al. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v.39, p.1851-1856, 2009.

PEREIRA-DA-SILVA, E. P. M.; OLIVEIRA, R. H. F.; DELNERO, B. Menthol as anaesthetic for lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000): attenuation of stress responses. **Aquaculture Research**, disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.12599/epdf>> p.1–8, 2014. Acesso em:17 mar 2016.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M. Parâmetros indicadores, efeitos fisiológicos e mitigação do estresse em lambaris, *Astyanax altiparanae*, Garutti e Britski, 2000 (Pisces, Characidae), **Tese Livre Docência** – Estresse e Bem-estar em peixes, Universidade de São Paulo, 2014.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F. "Physiological responses of lambari *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI 2000) to air exposure" **Aquaculture Research**, disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.13018/epdf>> p.1–4, 2016. Acesso em:21 mar 2016.

PICKERING, A. D.; CHRISTIE, P. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thiroxyne during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. **General and Comparative Endocrinology**, v.44, p.487-496,1981.

PICKERING, A. D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, v.111, p.51-63, 1993.

PICKERING, A. D. Introduction: The concept of biological stress. In: Pickering, A.D. (ed) **Stress and Fish**. Academic Press, London, p.1-9, 1981.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. **Biochemical effects of stress**. In: HOCHACKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (eds) Environmental and ecological biochemistry. Elsevier, Oxford, 1995, p.350–379.

PIPER, G. R. et al. **Fish hatchery management**. Washington: United States Department of the Interior, 1982. 517p.

PIRHONEN, J.; SCHRECK, C.B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.220, p.507-514, 2003.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambarido-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Espécies Nativas para Piscicultura**. Santa Maria: Edição, UFMS, p. 468. 2005.

PORTO-FORESTI, F. et al. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aqüicultura**, v.11, n. 67, p. 15-19. 2001.

PRIBORSKY, J. et al. Comparison of the effect of four anaesthetics on hematological profiles, oxidative stress and antioxidant enzymes in barbel (*Barbus barbus*). **Neuroendocrinology Letters**, v.36, p. 141-146, 2015.

PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. **Manual de piscicultura tropical**. IBAMA, Brasília, 1994. 195p.

RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. Catecholamines. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (eds.), **Fish physiology**, v.12b, Academic Press, New York, 1992, p.255-300.

RAMSAY, J. M. et al. Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. **Aquaculture**, v.297, p.157-162, 2009.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; LUQUE, J. L. Parasitological and hematological analysis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 from Guarapiranga reservoir, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum**, v.27, p.231-237, 2005.

REDDING, J. M.; SCHRECK, C. B. Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling coho salmon during stress. **Transactions of the American Fisheries Society** C, v. 112, p.80-87, 1983.

REID, S. G.; BERNIER, N. J.; PERRY, S. F. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology** B, v.120, p.1-27, 1998.

REID, S. G.; VIJAYAN, M. M.; PERRY, S. F. Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Physiology**, v.165, p.665-676, 1996.

ROACH, J. P. Glycogen and its metabolism. **Current Molecular Medicine**, v.2, p.101-120, 2002.

ROBERTSON, L. et al. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. **Progressive Fish-Culturist**, v. 49, n.1, p.1-12, 1987.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 236 p.

SABBAG, O. J. et al. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo-amarelo em monte castelo/SP: Um estudo de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, p.307-315, 2011.

SALARO, A. L. et al. Transport of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 in saline water **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 37, n. 2, p. 137-142, Apr.-June, 2015.

SALBEGO, J. et al. The essential oil from *Lippia alba* induces oxidative stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. **Neotropical Ichthyology**, v.12, p.811-818, 2014

SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Mecanismos de proteção oxidativa na utilização de antioxidantes in vivo em músculos animais. **Cadernos de Nutrição**, v.10, p.48-63, 1995.

SANTOS, R. A. et al. Dinâmica da nutrição do tambuí *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Pisces, Characiformes, Characidae) na represa de Ibatinga, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.22, n.1, p.115-124, 1995.

SATO, Y. et al. Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** v. 23, n 1, p. 267-273, 2006.

SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3 **User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SCHRECK, C. B. Stress and compensation in teleostean fishes: Response to social and physical factors. In: PICKERING, A. D. (ed.), **Stress and fish**, Academic Press, New York, 1981, p295-321.

SELYE H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal** v.1, p.1383-1392.1950.

SELYE H. The evolution of the stress concept. **American Scientist**, v.61, p. 692-699, 1973.

SHABANI, F. et al. Live transport of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and subsequent live storage in market: Water quality, stress and welfare considerations. **Aquaculture**, v.453, p.110-115, 2016.

SHI, H. et al. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.140, p.115-121, 2005.

SHI, X. et al. Optimal starvation time before blood sampling to get baseline data on several blood biochemical parameters in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. **Aquaculture Nutrition**, v.16, p.544-548, 2010.

SHIM, K. B.; YOON H. D. Effect of Transport Stocking Density on the physicochemical Characteristics of Muscle from Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*, **Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p.707-712, 2014.

- SIMÕES, L. N. et al. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá**, v. 34, n.2, p.175-181, 2012.
- SLADKY, K. K. et al. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p.337-342, 2001.
- SLOMAN, K. A. et al. Stress from air immersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v.59, p.186-190, 2001.
- SMALL B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v.218, p.177-185, 2003.
- SOENGAS, J. L.; ALBEGUNDE, M.; ANDRÉS, M.D. Gradual transfer to sea water of rainbow trout: Effects on liver carbohydrate metabolism. **Journal of Fish Biology**, v.47, p.466-478, 1995.
- SOTO, C. G.; BURHANUDDIN, C. G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v.136, p.149-152, 1995.
- SOUTHHORN, P.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v.63, p.390-408, 1988.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.29, p.1715-1733, 1996.
- SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L. S. Anesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. **Methods for fish biology**. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1990. p.213-272.
- SUMPTER, J. P.; DYE, H. M.; BENFEY, T. J. The effects of stress on plasma ACTH, a-MSH and cortisol levels in salmonid fishes. **General and Comparative Endocrinology**, v.62, p.377-385, 1986.
- SVOBODOVÁ, Z.; VYSUKOVÁ, B. Diagnostics; prevention and therapy of fish disease and intoxications. **Manual for International Training Course on Fresh-Water Fish Diseases and Intoxications**, Vodnany, Czechoslovakia. 1991, 270p.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) (Osteichthyes: Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, p.899-926, 2000.
- TONI, C. et al. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal of Applied Toxicology**, v.30, p.590-595, 2010.

- TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.35, p.1366-1375, 2011.
- TRIPATHI, R. et al. Physiological responses to acute experimental hypoxia in the air-breathing Indian catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Biosciences**, v.38, p.373-383, 2013.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Sodium chloride added to transport water and physiological responses of Matrinxã *Brycon amazonicus* (Teleost: Characidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v.36, n. 4, p. 569-572, 2006.
- VELISEK, J. et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, v.310, p.369-375, 2011.
- VIEIRA, V. A.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Effect of aluminium on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.157, p.1-8, 2013.
- VIJAYAN, M. M.; ALURU, N.; LEATHERLAND, J.F. Stress response and the role of cortisol. In: LEATHERLAND, J. F.; WOO, P. T. K. (Eds.), **Fish Diseases and Disorders**, v.2 International, Wallingford, 2010, p.182-201.
- VIJAYAN, M. M. et al. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.116 (c) 89-95, 1997.
- VIJAYAN, M. M. et al. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. **General and Comparative Endocrinology**, v.96, p.75-84, 1994.
- VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Acute handling stress alters hepatocytic glycogen metabolism in food deprived rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Canadian Journal of aquatic science**, v.49, p.2260-2266, 1992.
- VINAGRE, C. et al. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, v.23, p.274-279, 2012.
- VINATEA, L. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: UFSC, 2004. 345p.
- VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.72, p.1084-1087, 1970.
- WEBER, R. A. et al. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, cloveoil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v. 321, p.108-112, 2011.

- WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; MCLEAY, D. J. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Eds) **Methods for Fish Biology**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p.451-489, 1990.
- WEDEMEYER, G. A. Effect of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press, 1997, p. 35-71.
- WEDEMEYER, G. A.; MCLEAY, D. J. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A.D. (ed.), **Stress and fish**, Academic Press, New York, 1981, p.247-275.
- WEDEMEYER, G. A. **Physiology of Fish in Intensive Culture Systems**. Chapman Hall, New York. New York, USA, 1996, 232p.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiology Review**, v.77, p.591-625, 1997.
- WINTON, J. R. **Fish health management**. In: WEDEMEYER, G. A. (ed.) *Fish Hatchery Management*, American Fisheries Society, Bethesda, MD, p. 559-639, 2001.
- WOOD, C. M.; PERRY, S. F. Respiratory, circulatory, and metabolic adjustments to exercise in fish. pp. 2-22. In: R. GILLES (Ed.). **Circulation, Respiration and Metabolism**. Berlin, Springer-Verlag, 1985.
- WURTS, W. A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v. 26 p. 80-81.1985.
- XING, H. et al. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.103, p.74-80, 2012.
- YANG, B. H. et al. Activation of vanilloid receptor 1(VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003.
- YONAR, M. E.; SAKIN, F. Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.99, p. 226-231, 2011.
- ZEPPENFELD, C. C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture** v.418-419, p.101-107, 2014.