

1 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
2 INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

3
4
5
6
7
8 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE NO TRANSPORTE DE
9 JUVENIS DE BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum*

10
11
12
13 JANAÍNA DOS SANTOS PEDRON

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26 FURG
27 RIO GRANDE, RS.

28 2013

29 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
30 INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Dissertação de Mestrado

31
32
33
34
35
36 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE NO TRANSPORTE DE
37 JUVENIS DE BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum*

38
39 JANAÍNA DOS SANTOS PEDRON

40
41
42
43 Dissertação de Mestrado
44 apresentada ao Programa de Pós-
45 Graduação em Aquicultura da
46 Universidade Federal do Rio Grande
47 (FURG) como requisito para a
48 obtenção do título de MESTRE.

49
50
51 Orientador: Dr. Luís André Sampaio

52
53
54 Rio Grande, RS.
55 Março, 2013

Agradecimentos

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88

Ao Prof. Dr. Luís André Sampaio, por me orientar, colaborando com sua experiência, disposição e paciência para sanar minhas dúvidas e auxiliar nos experimentos.

Ao Prof. Dr. José Monserrat do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da FURG, pelo auxílio nas análises de cortisol, que infelizmente não geraram dados plausíveis.

À estudante de pós-doutorado Denise Miron, por ajudar nos experimentos e por realizar as análises de estresse oxidativo no Laboratório de Bioquímica Comparada da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Aos colegas MSc. Ricardo Rodrigues e Dr. Marcelo Okamoto, que além de grandes amigos, sempre me auxiliaram na projeção e execução dos desenhos experimentais.

A todos os colegas de trabalho que me ajudaram a executar os experimentos, seja anotando os dados, carregando caixas de transporte ou dirigindo a caminhonete.

Ao Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM), pelo agradável ambiente de trabalho, e por todos estarem sempre dispostos a ajudar no que for preciso.

A todos que trabalham na Estação Marinha de Aquicultura (EMA), por fazer de um laboratório uma grande família.

Aos amigos que conquistei no curso de pós-graduação, pelos momentos de descontração (dentro e fora do ambiente de trabalho) e por terem paciência comigo em dias (específicos) não muito bons.

Aos amigos do curso de Oceanologia que permaneceram no Cassino após a graduação, pela amizade e carinho.

Aos meus pais Paulete e Alceu, à minha avó Sidronia, aos meus irmãos Fernando e Mariana, à boadrasta Rose e a toda família pelo amor, compreensão, apoio e incentivo durante o Mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

89	Índice	
90		
91	Resumo Geral	v
92	Abstract.....	vi
93	Introdução Geral	1
94	<i>Rachycentron canadum</i>	1
95	Respostas fisiológicas	1
96	Benzocaína.....	3
97	Estresse oxidativo	4
98	Transporte	6
99	Objetivos.....	9
100	Referências Bibliográficas.....	10
101	CAPÍTULO I: Benzocaína como anestésico para juvenis de bijupirá <i>Rachycentron</i>	
102	<i>canadum</i>	17
103	CAPÍTULO II: Avaliação do estresse no transporte de juvenis de bijupirá <i>Rachycentron</i>	
104	<i>canadum</i> : efeito do anestésico benzocaína e diferentes densidades.....	39
105	Conclusões.....	57
106		
107		
108		
109		
110		
111		
112		
113		
114		
115		
116		
117		
118		
119		
120		
121		
122		
123		
124		

125 **Resumo Geral**

126

127 O presente estudo avaliou o uso do anestésico benzocaína e a resposta do estresse no
128 transporte de juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*. Para determinação de
129 concentração ótima, os peixes (9,4 g) foram expostos a 30, 50 e 70 mg L⁻¹ de
130 benzocaína. Para avaliar parâmetros sanguíneos e de estresse oxidativo, os peixes (16 g)
131 foram expostos às mesmas concentrações anteriores. Para 30 mg L⁻¹ de benzocaína, os
132 peixes excederam 10 min para alcançar o último estágio de anestesia, sendo que para 50
133 e 70 mg L⁻¹ este tempo foi de até 3 min. Para recuperação, os peixes expostos entre 30 e
134 50 mg L⁻¹ retornaram em até 3 min, enquanto aqueles expostos a 70 mg L⁻¹ excederam
135 10 min. Para proteína carbonil e TBARS, os maiores valores foram encontrados no
136 fígado, onde a concentração de 30 mg L⁻¹ apresentou os maiores níveis (P<0,05) para
137 proteína carbonil e 50 e 70 mg L⁻¹ apresentaram os maiores níveis (P<0,05) para
138 TBARS. Ainda no tecido hepático, foram encontrados simultaneamente os maiores e os
139 menores valores (P<0,05) de GST e GSH, respectivamente. Também foram realizados
140 dois experimentos de transporte (8 h). Os peixes foram embalados em sacos de
141 polietileno e acondicionados em caixas de isopor. No primeiro experimento, foram
142 avaliados duas concentrações de benzocaína (2 e 6 mg L⁻¹) e um tratamento isento de
143 anestésico. Para avaliação dos parâmetros hematológicos, foram coletadas amostras de
144 sangue dos peixes (30,9 g) antes do transporte (controle), 0, 2, 24 e 48 h após o
145 transporte. No segundo experimento, os peixes (37,5 g) foram embalados nas
146 densidades de 10, 20 e 30 g L⁻¹ e os parâmetros hematológicos foram medidos
147 anteriormente ao transporte (controle), 0, 2 e 24 h depois do transporte. Para ambos os
148 experimentos, foram coletadas amostras de água para medição do pH e concentrações
149 de oxigênio dissolvido, amônia e CO₂. Não foi observada mortalidade no experimento
150 com adição de benzocaína. No tempo 0 h, a glicemia foi maior para 6 mg L⁻¹ (P<0,05)
151 de benzocaína, embora em 48 h já tenha retornado a valores similares ao controle. Foi
152 observada mortalidade de 39,5% dos peixes na densidade de 30 g L⁻¹. A concentração
153 de CO₂ foi significativamente maior (P<0,05) na densidade de 30 g L⁻¹. A glicemia na
154 densidade de 30 g L⁻¹ foi maior (P<0,05) que nos outros tratamentos, retornando a
155 valores próximos ao controle apenas para 20 e 30 g L⁻¹ depois de 24 h. Os resultados
156 sugerem que para juvenis de bijupirá: i) a concentração ideal de benzocaína para sua
157 anestesia é de 50 mg L⁻¹; ii) não há vantagem no uso de benzocaína em seu transporte; e
158 iii) não devem ser transportados por 8 h em densidades maiores que 20 g L⁻¹.

159 **Abstract**

160

161 This study evaluated the use of the anesthetic benzocaine and the stress response during
162 transportation for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. For determination of optimal
163 concentration of benzocaine, fish (9.4) were exposed to benzocaine 30, 50 and 70 mg L⁻¹
164 ¹. Then, to evaluate hematological parameters and oxidative stress, fish (16 g) were
165 exposed to the same previously concentrations. At 30 mg L⁻¹ benzocaine, fish took more
166 than 10 min to reach the last anesthesia stage, however fish anesthetized at 50 and 70
167 mg L⁻¹ took less than 3 min. Recovery time for fish exposed between 30 and 50 mg L⁻¹
168 returned in less than 3 min, while fish exposed at 70 mg L⁻¹ exceeded 10 min. For
169 carbonil protein and TBARS, the highest values were in the liver, where 30 mg L⁻¹
170 showed the highest levels (P<0,05) to CP, while 50 and 70 mg L⁻¹ showed the highest
171 levels (P<0,05) to TBARS. Still in liver tissue, the increased GST (P<0,05) activity was
172 concomitant to the decreases in GSH (P<0,05), indicating a deficiency in the
173 antioxidant system. Also, two experiments were conducted to evaluate the stress
174 response during transportation (8 h). Fish were packed in polyethylene bags and placed
175 in styrofoam boxes. In the first experiment, two benzocaine concentrations (2 and 6 mg
176 L⁻¹) were evaluated and a control group without anesthetic. To evaluate hematological
177 parameters, blood samples were collected from the fish (30.9 g) before transportation
178 (control), 0 (immediately after transport), 2, 24 and 48 h after transport. In the second
179 experiment, the fish (35.7 g) were packed at the densities 10, 20 and 30 g L⁻¹ and
180 hematological parameters were measured before transport (control), 0, 2 and 24 h after
181 transport. For both experiments, water samples were collected to verify pH and
182 concentrations of oxygen, ammonia and CO₂. No mortality was observed in the
183 experiment with benzocaine. Glucose at 0 h was higher (P<0,05) for 6 mgL⁻¹
184 benzocaine, although at 48 h the level was similar to control. There was 39.5% of
185 mortality at the density 30 g L⁻¹. The CO₂ was higher (P<0.05) at the density 30 g L⁻¹.
186 Glucose at the density of 30 g L⁻¹ was higher (P<0,05) than in the other treatments,
187 returning to the control level just at 20 and 30 g L⁻¹ after 24 h. The results suggest that
188 for juvenile cobia: i) the ideal benzocaine concentration for anesthesia is 50 mg L⁻¹; ii)
189 there is no advantage in using benzocaine for transporting; and iii) should not being
190 transported for 8 h at densities exceeding 20 g L⁻¹.

191 **1. Introdução Geral**

192

193 *1.1. Bijupirá *Rachycentron canadum**

194

195 O bijupirá, *Rachycentron canadum*, é um peixe costeiro, pelágico, migratório,
196 único membro da família Rachycentridae. Essa espécie está amplamente distribuída nos
197 oceanos tropicais e subtropicais, exceto na costa leste do Oceano Pacífico (Shaffer e
198 Nakamura, 1989) e da costa Atlântica da Europa. Nos últimos dez anos, o bijupirá tem
199 recebido uma maior atenção dos pesquisadores e produtores por ser uma espécie
200 promissora para aquicultura, sendo comercialmente criada em viveiros, tanques-rede e
201 em sistemas de recirculação de água, demonstrando rápido crescimento, elevada
202 sobrevivência na fase de juvenil e engorda, alta eficiência alimentar e carne de boa
203 qualidade (Webb Jr. et al., 2007).

204 Dessa forma, é importante estabelecer subsídios para o cultivo do bijupirá como
205 uma nova espécie para aquicultura, sendo que mais estudos são necessários para o
206 desenvolvimento do seu completo potencial econômico (Holt et al., 2007). Além disso,
207 mais especificamente, há pouco conhecimento sobre sua adaptação às práticas de
208 manejo em aquicultura, que expõe os peixes a condições de estresse agudo, conduzindo
209 ao desenvolvimento de respostas fisiológicas adaptativas (Cnaani e McLean, 2009).

210

211 *1.2. Respostas fisiológicas de estresse*

212

213 O manejo de peixes, tanto em seu meio natural como em laboratório, quase
214 sempre provoca estresse nesses organismos, podendo causar distúrbios fisiológicos e
215 comportamentais (Ross e Ross, 1999; Iversen et al., 2003).

216 O estresse é definido como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico dos
217 organismos, conhecido como homeostase, é perturbado por estímulos intrínsecos ou
218 extrínsecos, definidos como estressores. As ações dos estressores provocam um
219 conjunto coordenado de comportamento e respostas fisiológicas, com o intuito
220 compensatório e/ou adaptativo, permitindo ao animal superar o estímulo estressor
221 (Iversen et al., 2009). Para uma integração das respostas ao estresse em peixes, foi
222 definida a distinção entre respostas primárias, secundárias e terciárias. As respostas
223 primárias estão relacionadas à ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-interrenal (HPI),
224 resultando em um aumento no nível de catecolaminas e cortisol no sangue, que
225 estimulam a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado . As respostas secundárias

226 são ações imediatas ou efeitos desses hormônios no sangue e tecidos, incluindo aumento
227 do batimento cardíaco, consumo de oxigênio e mobilização de substratos de energia, o
228 que acarreta o aumento da glicemia e da concentração de hemoglobina, além de
229 distúrbio no balanço hidromineral. Já a resposta terciária se estende ao organismo ou a
230 população, pela inibição do crescimento, reprodução, resposta imune e menor
231 capacidade de tolerar estressores subsequentes (Wendelaar Bonga, 1997; Wagner et al.,
232 2003; Palić et al., 2006).

233 A hiperglicemia tem o papel de fornecer energia para peixes em situações
234 adversas. Nessas situações de estresse, há a utilização de reservas de glicogênio no
235 fígado por glicogenólise, disponibilizando energia para o organismo se adaptar às novas
236 condições ambientais (Wendelaar Bonga, 1997).

237 Peixes submetidos a um estressor tendem a apresentar um maior percentual de
238 hematócrito devido a uma combinação de edema dos eritrócitos e contrações no baço,
239 que libera eritrócitos na corrente sanguínea (Olsen et al., 2005), podendo ser uma
240 resposta imediata ao estresse, mediada por catecolaminas (Tort et al., 2002). O aumento
241 da densidade das hemácias no sangue pode ser uma estratégia para melhorar a
242 capacidade no transporte de oxigênio sob condições de estresse (Ortuño et al., 2001;
243 Caruso et al., 2005; Trenzado et al., 2006).

244 A liberação de cortisol no sangue é uma resposta primária em peixes e tem como
245 importância fisiológica a regulação do balanço hidromineral e metabolismo energético.
246 Por isso, mudanças na osmolalidade são características de respostas secundárias ao
247 estresse (Wendelaar Bonga, 1997). O cortisol estimula atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas
248 brânquias, intestino e rim, e a osmolalidade é um indicador útil na avaliação da
249 capacidade de excreção desses órgãos (Iversen et al., 2009).

250 Pouco se conhece sobre o estresse em bijupirá. As alterações dos níveis de
251 cortisol e glicose em juvenis (300 g) seguem padrão semelhante ao apresentado por
252 outras espécies após sofrerem a ação de um estressor agudo, atingindo picos de 62 ng
253 mL^{-1} e 195 mg dL^{-1} , respectivamente, quando mantidos a 24,5°C (Cnaani e McLean,
254 2009). Trushenski et al. (2010) avaliaram a resposta de estresse do bijupirá e mostraram
255 valores de até 232 ng ml^{-1} para cortisol, 184 mg dl^{-1} para glicose e 439 mosmol Kg^{-1}
256 para osmolaridade em juvenis de 50 g mantidos a 27,5°C. Os peixes do controle
257 obtiveram valores de 15 ng mL^{-1} para cortisol, 38 mg dL^{-1} para glicose e 358 mosmol
258 Kg^{-1} para osmolalidade.

259

260 1.3. Benzocaína

261

262 Anestésicos são comumente utilizados no manejo em pisciculturas durante
263 procedimentos como triagem, transporte, marcação, extrusão de gametas, biometria,
264 coleta de sangue, cirurgia, vacinação, além de outros procedimentos experimentais com
265 o objetivo de facilitar a manipulação e minimizar a resposta ao estresse dos peixes
266 (Small, 2003; Holloway et al., 2004; Zahl et al., 2010). Os danos causados por um
267 manejo mal sucedido implicam em uma maior suscetibilidade dos peixes a patógenos e
268 doenças infecciosas (Inoue et al., 2003).

269 A escolha de um anestésico para manipulação de peixes implica em algumas
270 considerações importantes: eficácia do produto, custo, disponibilidade no mercado,
271 facilidade na manipulação e segurança para os peixes, humanos e meio ambiente
272 (Marking e Meyer, 1985). A eficácia e segurança de qualquer anestésico variam entre as
273 espécies, estágios de desenvolvimento e condições ambientais (King et al., 2005). É
274 necessário saber a concentração ideal de um anestésico, pois concentrações
275 inapropriadas acarretam em efeitos indesejados, podendo eventualmente causar
276 mortalidades (Roubach et al., 2005).

277 Nos últimos anos, a utilização de anestesia em peixes tem sido discutida quanto
278 aos aspectos da sua necessidade, suas técnicas e avaliação fisiológica. Estudos
279 revelaram que realmente há significativa evidência de que peixes sentem dor e medo,
280 conduzindo-os a um estado de estresse com relevante influência em seu metabolismo
281 (Braithwaite e Boulcott, 2007). Assim, é importante estudar e comparar diferentes
282 anestésicos em peixes e relacionar esses resultados a parâmetros fisiológicos (Guénete
283 et al., 2007).

284 Os compostos químicos mais tradicionais para anestesia em piscicultura são a
285 tricaína metanosulfato (MS-222) e a quinaldina, porém esses produtos podem induzir
286 problemas olfatórios em peixes, além de serem relativamente caros (Losey e Hugie,
287 1994; Gomes et al., 2001). A tricaína metanosulfato é o único anestésico aprovado pela
288 Food and Drugs Administration (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos
289 responsável pelo controle de alimentos e medicamentos (Meinertz e Schreier, 2009). No
290 entanto, esse anestésico é considerado cancerígeno e necessita de um período de espera
291 de 21 dias para que o peixe possa ser destinado ao consumo humano (Pirhonen e
292 Schreck, 2003).

293 A benzocaína (4-aminobenzoato de etila) é um produto que atende as
294 considerações propostas por Marking e Meyer (1985) citadas anteriormente e auxilia na
295 maioria dos processos que envolvem manipulação de peixes (Gomes et al., 2001). Por
296 sua característica hidrofóbica, é necessário diluir a benzocaína em etanol ou acetona
297 antes de ser utilizada (Iversen et al., 2003). Após 24 h, o produto é eliminado pelos
298 peixes (Allen, 1988; Heo e Shin, 2010) e pode ser removido do efluente através de filtro
299 de carvão ativado (Howe et al., 1990). Segundo Ross e Ross (1999), a benzocaína não
300 interfere no crescimento nem sobre a capacidade reprodutiva dos peixes.

301

302 1.4. *Estresse oxidativo*

303

304 Embora a anestesia em peixes possa reduzir os distúrbios bioquímicos e
305 fisiológicos durante os processos de manejo, o anestésico pode induzir efeitos que
306 alterem os valores de estresse oxidativo (Velisek et al., 2011).

307 O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre oxidantes e
308 antioxidantes em favor dos oxidantes, conduzindo à ocorrência de danos celulares
309 oxidativos (Barbosa et al., 2008). Sobretudo, o estresse oxidativo ocorrerá devido a um
310 aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs), a uma deficiência no sistema
311 antioxidante, ou a uma insuficiente capacidade de reparação aos danos oxidativos.
312 Danos causados por EROs incluem alterações de macromoléculas celulares como
313 membranas lipídicas, DNA e/ou proteínas. Esta modificação pode alterar as funções
314 celulares devido a mudanças no pH ou concentração de cálcio intracelulares, podendo
315 levar a morte celular (Swan et al., 1991; Dorval et al., 2005).

316 A peroxidação lipídica (LPO), medida como substâncias reativas ao ácido
317 tiobarbitúrico (TBARS), tem sido reportada como a maior responsável pela perda da
318 função celular em condições de estresse oxidativo, sendo utilizada como biomarcador
319 em diversos estudos (Roméo et al., 2000; Huang et al., 2003; Barata et al., 2005;
320 Cattaneo et al., 2011). Peroxidação lipídica é um mecanismo de lesão celular causado
321 por reações de radicais livres de oxigênio nas membranas biológicas, ricas em ácidos
322 graxos polinsaturados. Este processo forma hidroperóxidos de lipídios, que decompõem
323 a ligação dupla de ácidos graxos insaturados e destrói a membrana lipídica. Esses
324 lipídios altamente oxidáveis podem atacar proteínas vizinhas, causando uma formação
325 em excesso de proteínas carbonil (Lackner, 1998).

326 A formação de proteína carbonil pode ocorrer como resultado do estresse
327 oxidativo. O teor de proteína carbonil é atualmente o indicador mais comum, sendo o
328 marcador mais utilizado para avaliação da oxidação protéica. EROs convertem grupos
329 amino de proteínas e alteram sua estrutura e função. Uma dessas modificações é a
330 formação de radicais carbonil em aminoácidos de cadeia lateral. Os radicais são
331 quimicamente estáveis, tornando-os úteis para processos de detecção. Grupos carbonil
332 podem ser introduzidos em proteínas por diferentes meios: predominantemente pela
333 oxidação catalisada metálica, mas também por adução de lipídios oxidados ou açúcares
334 que contenham carbonil (Berlett e Stadtman, 1997; Requena et al., 2003; Almoroth et
335 al., 2005).

336 A enzima acetilcolinesterase (AChE) é conhecida por exibir o maior papel na
337 neurotransmissão colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses
338 colinérgicas, sendo amplamente encontrada no tecido muscular e nervoso (Sturm et al.,
339 1999; Stefano et al., 2008). Sua inibição está diretamente ligada a mecanismos de ação
340 tóxica de pesticidas organofosforados e carbamatos, porém estudos demonstram que a
341 atividade da AChE pode ser alterada por outros tipos de contaminantes, como por
342 exemplo metais pesados e pesticidas (Nemcsok et al., 1984; Lionetto et al., 2003).

343 Com a finalidade de minimizar o dano oxidativo aos componentes celulares, os
344 organismos desenvolvem sistemas de defesas antioxidantes (Barata et al., 2005). Para
345 avaliação da capacidade antioxidante, determina-se a atividade de enzimas
346 antioxidantes, dentre elas a catalase (CAT) e a glutationala-S-transferase (GST)
347 (Monteiro et al., 2006). A CAT é uma das enzimas que está na primeira linha de defesa
348 antioxidante, e tem como função converter o peróxido de oxigênio em água e oxigênio,
349 estando localizada em maior abundância nos peroxissomos (Halliwell, 2001; Ferreira et
350 al., 2010). A enzima GST catalisa a conjugação do tripeptídeo glutationala em sua forma
351 reduzida (GSH) com várias substâncias eletrofílicas, atuando no agrupamento dos
352 produtos da peroxidação lipídica à GSH, prevenindo o dano oxidativo (Barata et al.,
353 2005).

354 Assim, o GSH é um importante regulador não enzimático da homeostase redox
355 intracelular, estando presente em todos os tipos celulares em uma concentração
356 milimolar (Masella et al., 2005). A glutationala é um tripeptídeo encontrado nas formas
357 reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo importantes para manter a integridade do
358 ciclo catalítico da glutationala. Após exposição da GSH às espécies reativas, ocorre sua
359 oxidação a GSSG, por meio da glutationala peroxidase (GSH-Px) gerando peróxido de

360 hidrogênio, sendo um importante integrante do sistema de defesa enzimático contra o
361 aumento de radicais livres. O excesso de GSSG resulta em ambiente oxidante que
362 favorece a formação de pontes dissulfeto, que acabam por oxidar as proteínas,
363 danificando suas funções. Esta oxidação pode ser revertida pela ação antioxidante da
364 GSH. A glutathiona redutase (GR) não age diretamente na remoção de radicais livres,
365 porém é responsável pela recuperação da GSH, na presença de nicotinamida adenina
366 dinucleotídeo fosfato (NADPH), impedindo a paralisação do ciclo da glutathiona. Em
367 situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH,
368 porém em condições de excesso de agentes oxidante e/ou deficiência do sistema
369 protetor, ocorrerá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que
370 caracteriza o estresse oxidativo (Halliwell, 2001; Rover et al., 2001; Barbosa et al.,
371 2008). Portanto, a GSH atua tanto como um antioxidante não enzimático, como um
372 cofator ou substrato para as enzimas GSH-Px e GST (Barata et al., 2005).

373

374 1.5. Transporte

375

376 O transporte de peixes juvenis é um dos principais problemas em aquicultura,
377 pois sua prática pode causar estresse aos peixes (Gomes et al., 2003). Durante o
378 transporte, os peixes podem sofrer danos por interações físicas entre eles ou pelo atrito
379 contra as paredes do tanque (Cooke et al., 2004). Cuidados devem ser tomados em todos
380 os estágios do transporte para evitar que ocorram lesões e remoção da mucosa protetora,
381 pois ela atua como uma barreira física e química contra infecções, também sendo
382 importante para osmorregulação e locomoção (Conte, 2004).

383 O transporte é considerado um procedimento traumático que expõe os peixes a
384 uma série de estímulos adversos como captura, manipulação, transporte e estocagem
385 (Iversen et al., 1998). Esses estímulos são responsáveis por desencadear uma série de
386 respostas fisiológicas, sendo o transporte reconhecido como um estressor fisiológico
387 potencial (Urbinati et al., 2004; Chandroo et al., 2005).

388 Indicadores biológicos têm sido utilizados para monitorar a sensibilidade
389 fisiológica durante procedimentos de transporte (Chandroo et al., 2005). O emprego de
390 protocolos experimentais de estresse (Trushensky et al., 2010) e a avaliação de
391 parâmetros sanguíneos e hormônios são ferramentas úteis para o monitoramento do
392 estado fisiológico de peixes (Barton e Iwama, 1991; Bolasina, 2006; Dobsikova et al.,
393 2009). Um dos indicadores de estresse mais utilizados é a concentração de cortisol no

394 sangue. Como o nível de cortisol é normalmente elevado após o transporte, é sugerido
395 que o peixe esteja recuperado quando os valores de cortisol atinjam os níveis anteriores
396 ao transporte (Schreck et al., 1995). Indivíduos de diferentes espécies podem apresentar
397 diferenças em relação às respostas fisiológicas, na suscetibilidade a manipulação,
398 transporte e ambiente onde será liberado, sendo necessário estudar as respostas de
399 estresse para cada espécie (Chandroo et al., 2005).

400 Entre os meios de transporte de peixes, os mais comuns são barcos, transporte
401 rodoviário em caixas de transporte ou ainda transporte aéreo (King, 2009). Para o
402 transporte de juvenis no Brasil, é comum utilizar transporte rodoviário em sistema
403 fechado, com sacos de polietileno preenchidos com oxigênio (Golombieski et al., 2003).

404 Em sistemas fechados, a qualidade da água é também um precursor efetivo do
405 estresse e em muitos casos um fator limitante (Emata, 2000). As principais limitações
406 de um sistema fechado são o suprimento de oxigênio e o incremento de amônia e
407 dióxido de carbono produzido durante o transporte (Amend et al., 1982). A toxicidade
408 da amônia pode ser considerada um risco a saúde dos peixes durante o transporte e
409 depende da tolerância da espécie, da concentração, pH, temperatura e salinidade. Altas
410 concentrações de amônia diminuem a sobrevivência, o crescimento e a capacidade de
411 efetuar ajustes fisiológicos (Treasurer, 2010). Juvenis de bijupirá (1,74 g) cessam a
412 alimentação quando a concentração de amônia atinge 0,62 mg N-NH₃ L⁻¹, e foi
413 observada mortalidade de 50% da população em 1,13 mg N-NH₃ L⁻¹ (Rodrigues et al.,
414 2007). Em relação ao pH, o crescimento e a eficiência de conversão alimentar de
415 juvenis de bijupirá criados em sistema de recirculação de água é comprometido quando
416 o pH da água é reduzido de 7,0 (Sampaio et al., 2008).

417 Neste contexto, uma variedade de técnicas de transporte é empregada em
418 aquicultura com o objetivo de minimizar o estresse, por exemplo, a utilização de
419 anestésicos e controle da densidade de peixes (Gomes et al., 2003; Ashley, 2006;
420 Iversen et al., 2009).

421 Além disso, assim como em todos os procedimentos em aquicultura, a
422 habilidade e o manejo eficaz são de grande importância durante o transporte.
423 Treinamentos adequados, conhecimento dos sinais de estresse e condições apropriadas
424 de trabalho, são vitais para o bem estar dos peixes, sendo importante estabelecer um
425 protocolo de manejo adequado em operações estressantes como o transporte (Ashley,
426 2006; Gomes et al., 2003).

427 Colburn et al. (2008) estudaram o transporte de pequenos juvenis de bijupirá
428 (peso de 2-3 g) sob variadas condições de temperatura e densidade de estocagem. Eles
429 recomendam a densidade de 20 Kg/m³ para transporte com temperaturas entre 19 e
430 25°C por até 24 h. Entretanto, Liao et al. (2004) recomendam estocar para engorda em
431 tanques-rede peixes de 30 g, sendo que estes juvenis são de maior tamanho que os
432 avaliados em estudos por Colburn et al. (2008) e menores do que aqueles utilizados por
433 Cnaani e McLean (2009) e Trushenski et al. (2010).

434 Sendo assim, há a necessidade de se conhecer as respostas fisiológicas e
435 bioquímicas frente a condições de estresse, como exposição a anestésicos e ao
436 transporte para juvenis de bijupirá *R.canadum*.

437

438 **2. Objetivos**

439

440 *2.1. Objetivo geral*

441

442 Conhecer o efeito do anestésico benzocaína sobre juvenis de bijupirá e avaliar o
443 transporte de juvenis de bijupirá sob diferentes concentrações de benzocaína e
444 densidade de estocagem.

445

446 *2.2. Objetivos específicos*

447

- 448 • Determinar a concentração ideal de benzocaína para anestésiar juvenis de
449 bijupirá, verificando respostas secundárias de estresse (análise hematológica) e
450 análise de estresse oxidativo.
- 451 • Determinar a concentração de benzocaína e a densidade de estocagem adequada
452 para o transporte de bijupirá.
- 453 • Avaliar a resposta ao estresse a partir da análise de glicose e osmolalidade em
454 diferentes concentrações de benzocaína e densidades de estocagem.
- 455 • Estudar o efeito do transporte de bijupirá em diferentes concentrações de
456 benzocaína e densidades de estocagem sobre a qualidade da água através das
457 concentrações de oxigênio, amônia, dióxido de carbono e pH.

458

3. Referências Bibliográficas

- 459
460
- 461 Allen, J.L., 1988. Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish
462 meal. *Progressive Fish Culturist* 50, 59-60.
- 463 Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout
464 (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers.
465 *Aquatic toxicology* 73, 171–80.
- 466 Amend, N.F., Croy, T.R., Goven, B.A., Johnson, K.A., Mccarthy, D.H., 1982.
467 Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon
468 dioxide, pH and bacterial growth. *Transactions of the American Fisheries*
469 *Society* 111, 603-611.
- 470 Ashley, P., 2006. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal*
471 *Behaviour Science* 104, 199-235.
- 472 Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme
473 activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna*
474 exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and*
475 *Physiology C* 140, 175–86.
- 476 Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.C.G., Paula, S.O., Minin, V.P.R., Bressan,
477 J., 2008. Estresse oxidativo : avaliação de marcadores. *Nutrire: Revista da*
478 *Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição* 33(2), 111–128.
- 479 Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in
480 aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual*
481 *Review of Fish Diseases* 10, 3–26.
- 482 Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in aging, disease, and oxidative
483 Stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (33), 20313-20316.
- 484 Bolasina, S.N., 2006. Cortisol and hematological response in Brazilian codling,
485 *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment.
486 *Aquaculture International* 14, 569–575.
- 487 Braithwaite, V.A., Boulcott, P., 2007. Pain perception, aversion and fear in fish.
488 *Diseases of Aquatic Organisms* 75, 131-138.
- 489 Caruso, G., Genovese, L., Maricchiolo, G., Modica, A., 2005. Haematological,
490 biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus*
491 *labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquaculture International*
492 13, 67-73.

493 Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., Menezes, C.C., Moraes, B., Santi, A., Toni, C.,
494 Avila, L.A., Zanella, R., 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio*
495 exposed to the herbicide penoxsulam in rice field conditions. *Journal of Applied*
496 *Toxicology* 31, 626-632.

497 Chandroo, K.P., Cooke, S.J., Mckinley, R.S., Moccia, R.D., 2005. Use of
498 electromyogram telemetry to assess the behavioral and energetic responses of
499 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress.
500 *Aquaculture Research* 36, 1226-1238.

501 Cnaani, A., Mclean, E., 2009. Time-course response of cobia (*Rachycentron canadum*)
502 to acute stress. *Aquaculture* 289, 140-142.

503 Colburn, H.R., Walker, A.B., Berlinsky, D.L., Nardi, G., 2008. Factors affecting
504 survival of cobia, *Rachycentron canadum*, during simulated transport. *Journal of*
505 *the World Aquaculture Society* 39, 678-683.

506 Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour*
507 *Science* 86, 205-223.

508 Cooke, S., Suski, C.D., Ostrand, K.G., Tufts, B.L., Wahl, D.H., 2004. Behavioral and
509 physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for
510 handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*).
511 *Aquaculture* 239, 509-529.

512 Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein
513 carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329,
514 23-38.

515 Dobsikova, R., Svobodova, Z., Blahova, J., Modra, H., Velisek, J., 2009. The effect of
516 transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus*
517 *carpio* L.). *Czech Journal of Animal Science* 54 (11), 510-518.

518 Dorval, J., Leblond, V., Deblois, C., Hontela, A., 2005. Oxidative stress and endocrine
519 endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by
520 agricultural chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5), 1273-
521 1280.

522 Emata, A.C., 2000. Live transport of pond-reared milkfish *Chanos chunos* broodstock.
523 *Journal of the World Aquaculture Society* 31(2), 279-282.

524 Ferreira, D., Motta, A.C, Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010.
525 Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals.
526 *Chemosphere* 79, 914-921.

527 Golombieski, J., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B., Silva, J.H.S., 2003. Transport of silver
528 catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and
529 temperatures. *Aquaculture* 216, 95-102.

530 Gomes, L.C., Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Roubach, R., Araujo-Lima,
531 C.A.R.M., 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui
532 *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32(4), 426-
533 431.

534 Gomes, L.C., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A. R. M., Chippari-Gomes, A.R., Lopes,
535 N.P., Urbinati, E.C., 2003. Effect of fish density during transportation on stress
536 and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the*
537 *World Aquaculture Society* 34(1), 76-84.

538 Guénette, S.A., Uhlend, F.C., Hélie, P., Beaudry, F., Vachon, P., 2007.
539 Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
540 *Aquaculture* 266, 262-265.

541 Halliwell, B., 2001. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: *Nature*
542 *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, 1-7.

543 Heo, G.J., Shin, G., 2010. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp
544 (*Carassius carassius*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 37(2), 132-135.

545 Holloway, A.C, Keene, J.L., Noakes, D.G., Moccia, R.D., 2004. Effects of clove oil and
546 MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*,
547 Walbaum. *Aquaculture Research* 35, 1025-1030.

548 Holt, G.J., Faulk, C.K., Schwarz, M.H., 2007. A review of the larviculture of cobia
549 *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture* 268, 181-187.

550 Howe, G.E., Bills, T.D., Marking, L.L., 1990. Removal of benzocaine from water by
551 filtration with activated carbon. *Progressive Fish Culturist*, 52:32-35.

552 Huang, C.H., Chang, R.J., Huang, S.L., Chen, W.L., 2003. Dietary vitamin E
553 supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis*
554 *niloticus* x *O. aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 134, 265-
555 270.

556 Inoue, L.A.K.A., Santos Neto, C., Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for
557 juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural* 33(5),
558 943-947.

559 Iversen, M., Finstad, B., Nilssen, K.J., 1998. Recovery from loading and transport stress
560 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 168, 387-394.

561 Iversen, M., Finstad, B., Mckinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of
562 metomidate, clove oil, Aqui-STM and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic
563 salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity.
564 *Aquaculture* 221, 549-566.

565 Iversen, M., Eliassen, R.A., Finstad, B., 2009. Potential benefit of clove oil sedation on
566 animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea.
567 *Aquaculture Research* 40, 233-241.

568 King, W., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C., Berlinsky, D.L., 2005. The use of
569 clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for
570 inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea
571 bass (*Centropristis striata* L.). *Aquaculture Research* 36, 1442-1449.

572 King, H. R., 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road
573 transport of Atlantic salmon in Tasmania. *Journal of Veterinary Behavior:
574 Clinical Applications and Research* 4, 163-168.

575 Lackner, R., 1998. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. *Fish*
576 *Ecotoxicology*, 203–224.

577 Liao, I.C., Huang, T.S., Tsai, W.S., Hsueh, C.M., Chang, S.L., Leño, E.M., 2004.
578 *Cobia* culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture* 237, 155-
579 165.

580 Losey, G.S., Hugie, D.M., 1994. Prior anesthesia impairs a chemically mediated fright
581 response in a Gobiid fish. *Journal of Chemical Ecology* 20(8), 1877-1883

582 Marking, L.L., Meyer, F.P., 1985. Are better fish anesthetics needed in fisheries?
583 *Fisheries* 10, 2-5.

584 Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel
585 mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems:
586 involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of*
587 *Nutritional Biochemistry* 16, 577-586.

588 Meinertz, J.R., Schreier, T.M., 2009. Depletion of isoeugenol residues from the fillet
589 tissue of AQUIS™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
590 *Aquaculture* 296, 200-206.

591 Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress
592 biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to
593 organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative*
594 *Biochemistry and Physiology C* 143, 141–149.

595 Nemcsok, J., Nemeth, A., Buzas, Z.S., Boross, L., 1984. Effects of copper, zinc and
596 paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquatic
597 Toxicology 5, 23-31.

598 Olsen, E.R., Sundell, K., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Ringø, E., 2005. Acute stress alters
599 intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture
600 250, 480-495.

601 Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2001. Effects of short-term crowding stress on the
602 gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. Fish & Shellfish
603 Immunology 11, 187-97.

604 Oruç, E.O., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity
605 potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. Environmental
606 Toxicology and Pharmacology 23, 48-55.

607 Palić, D., Herolt, D.M., Andreassen, C.B., Menzel, B.W., Roth, J.A., 2006. Anesthetic
608 efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on
609 plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows
610 (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). Aquaculture 254, 675-685.

611 Pirhonen, J., Schreck, C.B., 2003. Effects of anaesthesia with MS-222 , clove oil and
612 CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus*
613 *mykiss*). Aquaculture 220, 507-514.

614 Requena, J.R., Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2003. Recent advances in the analysis of
615 oxidized proteins. Amino Acids 25, 221-226.

616 Rodrigues, R.V., Schwarz, M.H., Delbos, B.C., Sampaio, L.A., 2007. Acute toxicity
617 and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron*
618 *canadum*. Aquaculture 271, 553 - 557.

619 Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J., 2000. Cadmium
620 and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of
621 the sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquatic Toxicology 48, 185-194.

622 Roubach, R., Gomes, L.C., Fonseca, F.A.L., Val, A.L., 2005. Eugenol as an efficacious
623 anaesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier). Aquaculture
624 Research 36, 1056-1061.

625 Ross, L.G., Ross, B., 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.
626 Oxford, Blackwell Science. 159p.

- 627 Rover, J.L., Hoehr, N.F., Vellasco, A.P., 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo
628 metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do
629 estresse oxidativo. *Química Nova* 24 (1), 112-119.
- 630 Sampaio, L.A., Santos, R.A., Schwarz, M.H., Delbos, B.C., 2008. Growth and survival
631 of juvenile cobia *Rachycentron canadum* exposed to chronic acid stress. In:
632 WORLD AQUACULTURE. Resumos... Busan: World Aquaculture Society
633 2008. CD-ROM.
- 634 Shaffer, R.V., Nakamura, E.L., 1989. Synopsis of biological data on the cobia
635 *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). FAO Fisheries Synopsis. 153
636 (National Marine Fisheries Service/S 153), U.S. Department of Commerce,
637 NOAA Technical Report, National Marine Fisheries Service 82. Washington,
638 D.C.
- 639 Schreck, C., Jonsson, L., Feist, G., Reno, P., 1995. Conditioning improves performance
640 of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress.
641 *Aquaculture* 135, 99-110.
- 642 Small, B.C., 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma
643 cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil
644 anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218, 177-185.
- 645 Stefano, B., Ilaria, C., Silvano, F., 2008. Cholinesterase activities in the scallop *Pecten*
646 *jacobaeus*: Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants.
647 *Science of the Total Environment* 392, 99-109.
- 648 Sturm, A., da Silva de Assis, H.C, Hansen, P.-D., 1999. Cholinesterases of marine
649 teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring
650 of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 47, 389-398.
- 651 Swann, J.D., Smith, M.W., Phelps, P.C., Maki, A., Berezsky, I.K., Trump, B.F., 1991.
652 *Toxicologic Pathology*.
- 653 Tort, L., Puigcerver, M., Crespo, S., Padro's, F., 2002. Cortisol and haematological
654 response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-
655 phenoxyethanol. *Aquaculture Research* 33, 907-910.
- 656 Trenzado, C.E., Morales, A.E., Higuera, M.D., 2006. Physiological effects of crowding in
657 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress
658 responsiveness. *Aquaculture* 258, 583-593.

659 Treasurer, J.W., 2010. Remediation of ammonia accumulation during live transport of
660 juvenile cod, *Gadus morhua* L., and the effects of fast period on ammonia levels
661 and water quality. *Aquaculture* 308, 190-195.

662 Trushensky, J., Schwarz, M., Takeuchi, R., Delbos, B., Sampaio, L.A., 2010.
663 Physiological responses of cobia *Rachycentron canadum* following exposure to
664 low water and air exposure stress challenges. *Aquaculture* 307, 173-177.

665 Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Parra, M.A.L., 2004. Loading and
666 transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various
667 densities. *Aquaculture* 229, 389-400.

668 Velisek, J., Stara, A., Li, Z.H., Silovska, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects
669 of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress
670 biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture* 310, 369–375.

671 Wagner, G.N., Singer, T.D., Mckinley, R.S., 2003. The ability of clove oil and MS-222
672 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
673 *Aquaculture Research* 34, 1139-1146.

674 Webb Jr., K.A., Hitzfelder, G.M., Faulk, C.K., Holt, G.J., 2007. Growth of juvenile
675 cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating
676 aquaculture system. *Aquaculture* 264, 223-227.

677 Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77,
678 591-625.

679 Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O.B., Olsen, R.E., 2010. Anesthesia induces stress
680 in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic
681 halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 36(3),
682 719-30.

683

684 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
685 INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
686 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

687

688

689

690

691

692

693

694

CAPÍTULO I

695

696

697

698

699

700

Benzocaína como anestésico para juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*

701

702 **Resumo**

703

704 Anestésicos são importantes em aquicultura por permitirem reduzir o estresse no
705 manejo e minimizar eventuais mortalidades. O presente estudo avaliou o uso do
706 anestésico benzocaína para juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*. Para
707 determinação de concentração ótima, os peixes (9,4 g) foram expostos a 30, 50 e 70 mg
708 L⁻¹ de benzocaína (n=6). Um segundo experimento foi feito para avaliar parâmetros
709 sanguíneos e de estresse oxidativo, onde os peixes (16 g) foram expostos às mesmas
710 concentrações de benzocaína. Após 24 h, foram coletadas amostras de sangue para a
711 determinação de glicose e hematócrito, além de amostras de tecidos para avaliar a
712 atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), os níveis de proteína carbonil,
713 substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatona reduzida (GSH),
714 glutatona-S-transferase (GST) e atividade da catalase (CAT). Anteriormente ao
715 experimento, nove peixes não anestesiados foram coletados (grupo controle) e os
716 mesmos parâmetros foram avaliados. Para 30 mg L⁻¹ de benzocaína, os peixes
717 demoraram mais de 10 min para alcançar o último estágio de anestesia, tempo maior
718 que para anestesiados em 50 e 70 mg L⁻¹ (até 3 min). O tempo de recuperação para
719 peixes expostos entre 30 e 50 mg L⁻¹ foi menor que 3 min, enquanto aqueles expostos a
720 70 mg L⁻¹ excederam 10 min. Não ocorreram diferenças para glicemia e hematócrito, e
721 para os biomarcadores CAT e AChE ao longo do tempo. Os níveis de proteína carbonil
722 diminuíram nas brânquias de peixes em todas as concentrações testadas. A carbonilação
723 também diminuiu em cérebro e músculo (50 e 70 mg/L). No fígado, a proteína carbonil
724 aumentou na concentração de 30 mg/L. Peixes mostraram diminuição de TBARS nas
725 brânquias (30 e 70 mg/L) e no cérebro. TBARS no fígado (50 e 70 mg/L) e no músculo
726 aumentaram. Os níveis de GSH no fígado diminuíram apenas em 30mg/L. Os valores de
727 GST estavam diminuídos nas brânquias e aumentados no fígado (30 e 50 mg/L). O
728 tecido hepático apresentou diminuição nos valores de GSH e aumento de GST em 30
729 mg/L de benzocaína, indicando uma possível deficiência no sistema antioxidante.
730 Assim, a benzocaína parece ser eficaz quando administrada à concentração de 50 mg L⁻¹
731 para juvenis de bijupirá *R. canadum*, por apresentar períodos de anestesia e de
732 recuperação considerados ideais, sem alteração dos parâmetros hematológicos e
733 menores alterações nos parâmetros de estresse oxidativo.

734

735 **Abstract**

736

737 Anesthetics are important in fish culture to reduce handling stress and possible
738 mortality. This study evaluated the use of benzocaine as anesthetic for juvenile cobia
739 *Rachycentron canadum*. For determination of optimal concentration, fish (9.4 g) were
740 exposed to benzocaine 30, 50 and 70 mg L⁻¹ (n=6). Then, a second experiment was
741 conducted to evaluate hematological parameters and oxidative stress, where fish (16 g)
742 were exposed to the same previously benzocaine concentrations. After 24 h, blood
743 samples were collected to determine glucose and hematocrit, and also tissues samples to
744 evaluate the enzymatic activity from acetylcholinesterase (AChE), thiobarbituric acid-
745 reactive substances (TBARS) levels, reduced glutathione (GSH), glutathione-S-
746 transferase (GST) and catalase activity. Before the experiment, nine fish no anesthetized
747 were collected (control group) and the same parameters were evaluated. At 30 mg L⁻¹
748 benzocaine, fish took more than 10 min to reach the last anesthesia stage, longer time
749 than fish anesthetized at 50 and 70 mg L⁻¹ (until 3 min). Recovery time for fish exposed
750 between 30 and 50 mg L⁻¹ was less than 3 min, while fish exposed at 70 mg L⁻¹
751 exceeded 10 min. There were no differences in the hematological parameters glucose
752 and hematocrit, nor in the biomarkers CAT and AChE levels over time. CP levels
753 decreased in gills in all tested concentrations. The carbonylation also decreased in brain
754 and muscle (50 and 70 mg L⁻¹). The carbonyl protein increased in liver at 30 mg L⁻¹.
755 TBARS was reduced in gills (30 and 70 mg L⁻¹) and brain. TBARS increased in liver
756 (50 and 70 mg L⁻¹) and muscle. GSH levels in liver decreased at 30 mg L⁻¹. GST values
757 were lower in gills and higher in the liver (30 and 70 mg L⁻¹). The hepatic tissue showed
758 decrease in GSH values and increase in GSR at 30 mg L⁻¹, indicating a deficiency in the
759 antioxidant system. Thus, benzocaine appears to be effective when administered at a
760 concentration of 50 mg L⁻¹ for juvenile bijupirá *R. canadum*, by presenting periods of
761 anesthesia and recovery considered ideal, not altered hematological parameters and
762 minor changes in the oxidative stress parameters.

763

764

765 **1. Introdução**

766

767 Anestésicos são comumente utilizados no manejo em pisciculturas durante
768 procedimentos como triagem, transporte, marcação, extrusão de gametas, biometria,
769 coleta de sangue, cirurgia, vacinação, além de outros procedimentos experimentais com
770 o objetivo de facilitar a manipulação e minimizar a resposta ao estresse dos peixes
771 (Small, 2003; Holloway et al., 2004; Zahl et al., 2010). Os danos causados por um
772 manejo mal sucedido implicam em uma maior suscetibilidade dos peixes a patógenos e
773 doenças infecciosas (Inoue et al., 2003).

774 A escolha de um anestésico para manipulação de peixes implica em algumas
775 considerações importantes: eficácia do produto, custo, disponibilidade no mercado,
776 facilidade na manipulação e segurança para os peixes, humanos e meio ambiente
777 (Marking & Meyer, 1985). A eficácia e segurança de qualquer anestésico variam entre
778 as espécies, estágios de desenvolvimento e condições ambientais (King et al., 2005). É
779 necessário saber a concentração ideal de um anestésico, pois concentrações
780 inapropriadas acarretam em efeitos indesejados, podendo eventualmente causar
781 mortalidades (Roubach et al., 2005). A benzocaína (4-aminobenzoato de etila) é um
782 composto que atende as considerações propostas por Marking & Meyer (1985) e auxilia
783 na maioria dos processos que envolvem manipulação de peixes (Gomes et al., 2001).

784 Embora a anestesia possa auxiliar nas práticas de aquicultura reduzindo os
785 distúrbios bioquímicos e fisiológicos, o anestésico pode implicar em efeitos que alteram
786 tanto parâmetros hematológicos como valores de estresse oxidativo (Bolasina, 2006;
787 Velisek et al., 2011).

788 Peixes expostos a estressores desencadeiam respostas de estresse, que podem ser
789 crônicas ou agudas, dependendo da intensidade e duração. Dentre essas respostas, há
790 mudanças em hormônios do plasma, no metabolismo energético e no balanço
791 hidromineral. Estes efeitos provocam respostas secundárias relacionadas a requerimento
792 energético, como o aumento da glicemia no sangue (Wandelaar Bonga, 1997; Bolasina,
793 2006).

794 O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação
795 de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante em favor de
796 EROS (Sturve et al., 2008). Duas perturbações resultantes do estresse oxidativo são a
797 peroxidação lipídica e a formação de proteína carbonil. A peroxidação lipídica, medida
798 como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tem seus produtos

799 formados a partir da retirada de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo
800 polinsaturado (Almroth et al., 2005; Oruç e Usta, 2007). A formação de proteína
801 carbonil ocorre como resultado do estresse oxidativo, onde EROs promovem alterações
802 em proteínas do grupo amino, modificando sua estrutura e função (Dalle-Donne et al.,
803 2003; Requena et al., 2003).

804 Para avaliação da capacidade antioxidante, é determinada a atividade de enzimas
805 antioxidantes, dentre elas a catalase (CAT) e a glutathione-S-transferase (GST)
806 (Monteiro et al., 2006). A CAT tem como função converter o peróxido de hidrogênio
807 em água e oxigênio, estando localizada em maior abundância nos peroxissomos
808 (Halliwell, 2001). A GST catalisa a conjugação do tripeptídeo glutathione em sua forma
809 reduzida (GSH) com várias substâncias eletrofílicas, atuando no agrupamento dos
810 produtos da peroxidação lipídica à GSH, prevenindo o dano oxidativo (Barata et al.,
811 2005). O GSH é o maior regulador não enzimático da homeostase redox intracelular,
812 estando presente em todos os tipos celulares em uma concentração milimolar (Masella
813 et al., 2005).

814 A enzima acetilcolinesterase (AChE) é conhecida por exibir o maior papel na
815 neurotransmissão colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses
816 colinérgicas, sendo amplamente encontrada nos tecidos muscular e nervoso (Sturm et
817 al., 1999; Stefano et al., 2008). Sua inibição está diretamente ligada a mecanismos de
818 ação tóxica de pesticidas organofosforados e carbamatos, porém estudos demonstram
819 que a atividade da AChE pode ser alterada por outros tipos de contaminantes (Nemcsok
820 et al., 1984; Lionetto et al., 2003).

821 O bijupirá *Rachycentron canadum* é considerada uma espécie promissora para a
822 aquicultura, pois demonstra rápido crescimento, elevada sobrevivência na fase de
823 juvenil e engorda, alta eficiência alimentar e carne de boa qualidade (Webb Jr. et al.,
824 2007). Experimentos com juvenis de bijupirá *R. canadum*, recomendam o uso de 20 mg
825 L⁻¹ do anestésico eugenol para procedimentos que requeiram imobilização de até 10
826 min, e 40 mg L⁻¹ de triclaína metano sulfonato (MS222) para procedimentos com
827 duração de até 20 min (Gullian e Vilanueva, 2009). Entretanto no Brasil, a literatura
828 referente a respostas de estresse oxidativo (em diferentes tecidos) com o uso de
829 benzocaína de bijupirá é escassa. Atualmente, para o bijupirá há pouco conhecimento
830 disponível sobre os efeitos após o uso dos anestésicos, não há protocolos experimentais
831 de anestesia com a benzocaína e faltam estudos que abordem estratégias para reduzir o

832 estresse nas práticas de manejo para esta espécie (Holt et al., 2007; Cnaani e McLean
833 2009; Trushenski et al., 2010).

834 Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a utilização do anestésico
835 benzocaína para juvenis de bijupirá *R.canadum*, determinando sua concentração ideal e
836 avaliando respostas hematológicas e bioquímicas.

837

838 **2. Material e Métodos**

839

840 *2.1. Experimento 1: Avaliação dos estágios de anestesia e de recuperação de juvenis de*
841 *bijupirá expostos a benzocaína*

842

843 Para avaliar a eficácia da benzocaína como anestésico, três concentrações foram
844 testadas: 30, 50 e 70 mg L⁻¹. A solução estoque foi preparada a partir da diluição da
845 benzocaína (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA) em álcool
846 comercial (96%), na proporção 1:9 (p:v). Os testes foram realizados em dois aquários de
847 vidro com volume de 30 L, na temperatura de 27,5°C e salinidade 30, que foram
848 mantidos constantes ao longo do experimento. Em um aquário foi adicionado o
849 anestésico para a indução da anestesia e no outro aquário, isento de benzocaína, foi
850 avaliada a recuperação dos peixes. A água foi totalmente trocada e os aquários foram
851 lavados a cada teste.

852 Os peixes foram mantidos em jejum durante 18 h antes dos testes em um tanque
853 circular de 250 L e foram rapidamente transferidos de forma aleatória para o aquário
854 com anestésico. A exposição ao anestésico ocorreu de maneira individual e foram
855 registrados os tempos em que os peixes atingiram os diferentes estágios de anestesia.
856 Ao atingirem o último estágio de anestesia, os peixes foram medidos e pesados, e
857 imediatamente transferidos para o aquário sem anestésico, onde foram observados e
858 registrados os diferentes estágios de recuperação. Para cada concentração foram
859 utilizados seis peixes (9,4 ± 2,1 g; 12,3 ± 1,0 cm) e a duração de cada estágio foi
860 monitorada com cronômetro digital. Os estágios de anestesia e de recuperação utilizados
861 foram baseados no trabalho de Park et al. (2008) e estão dispostos na Tabela 1.

862

863

864 Tabela 1: Estágios de anestesia e de recuperação de juvenis de bijupirá *Rachycentron*
865 *canadum* expostos a benzocaína.

866

Estágios	Característica comportamental
Anestesia	
A1	Perda de equilíbrio
A2	Fim da natação
A3	Batimento opercular irregular
Recuperação	
R1	Batimento opercular normal
R2	Início da natação
R3	Recuperação do equilíbrio

867 Modificado de Park et al., 2008.

868

869 Para verificar se houve interferência do álcool utilizado na diluição do anestésico
870 nos resultados, três peixes foram monitorados em um aquário semelhante ao utilizado
871 nos testes, onde foram adicionados 21 ml de álcool (volume referente à maior
872 concentração de anestésico testada).

873 Após os testes, os peixes foram transferidos para tanques de 250 L e
874 monitorados por 24 h para verificação de possível mortalidade.

875

876 2.2. Experimento 2: Hematologia e estresse oxidativo

877

878 Juvenis de bijupirá foram submetidos individualmente às concentrações 30, 50 e
879 70 mg L⁻¹ de benzocaína e foram observados até atingirem o estágio A3 de anestesia.
880 Para fins de comparação, ainda realizou-se um tratamento controle, sem adição de
881 benzocaína (0 mg L⁻¹). O experimento foi realizado com três repetições, sendo utilizados
882 no total nove peixes (16,0 ± 5,8 g; 14,8 ± 1,9 cm) para cada concentração.
883 Posteriormente, os peixes foram transferidos para tanques de 250 L onde foram
884 monitorados por 24 h. Anteriormente a exposição, foram amostrados nove peixes
885 diretamente dos tanques de manutenção para coleta de sangue. O sangue foi coletado
886 junto ao pedúnculo caudal, com auxílio de seringa heparinizada de 1 ml e agulha
887 hipodérmica de 26G ½”.

888 Após 24 h de observação, os peixes foram anestesiados em suas respectivas
889 concentrações e em seguida foram coletadas amostras de sangue. Uma parcela do
890 sangue foi imediatamente analisada, foi medida a glicemia com o glicosímetro Accu
891 Cheek Advantage. Para análise do hematócrito, foi utilizada a centrífuga micro-
892 hematócrito Micro Spin por 10 minutos. O restante do sangue foi congelado em
893 ultrafreezer (-86°C).

894 Posteriormente à coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por meio de
895 ruptura da medula espinhal e os tecidos fígado, brânquias, cérebro e músculo branco
896 foram removidos e imediatamente congelados em ultrafreezer (-86°C) para as análises
897 em laboratório.

898 A atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), EC 3.1.1.7, foi realizada
899 de acordo com Ellman et al. (1961), modificado por Miron et al. (2005). Foi
900 determinado os níveis de proteína carbonil de acordo Parvez e Raisuddin (2005). A
901 determinação de TBARS, foi medida pelo método de Ohkawa et al. (1979). A atividade
902 da glutathione-S-transferase (GST) foi dosada de acordo com Habig et al. (1974), e a
903 concentração de glutathione reduzida (GSH) foi determinada pela reação com o DTNB
904 em espectrofotômetro a 412 nm (Elmann et al., 1959). A atividade da catalase (CAT)
905 foi dosada de acordo com Nelson e Kiesow (1972).

906

907 *2.3. Análise Estatística*

908

909 Todos os resultados foram analisados por Análise de Variância (uma via). Foi
910 utilizado o Teste de Tukey quando encontradas diferenças significativas e todas as
911 análises foram feitas com nível de significância 95% (Sokal & Rohlf, 1995).

912

913 **3. Resultados**

914

915 *3.1. Experimento 1: Avaliação dos estágios de anestesia e recuperação de* 916 *juvenis de bijupirá expostos a benzocaína*

917

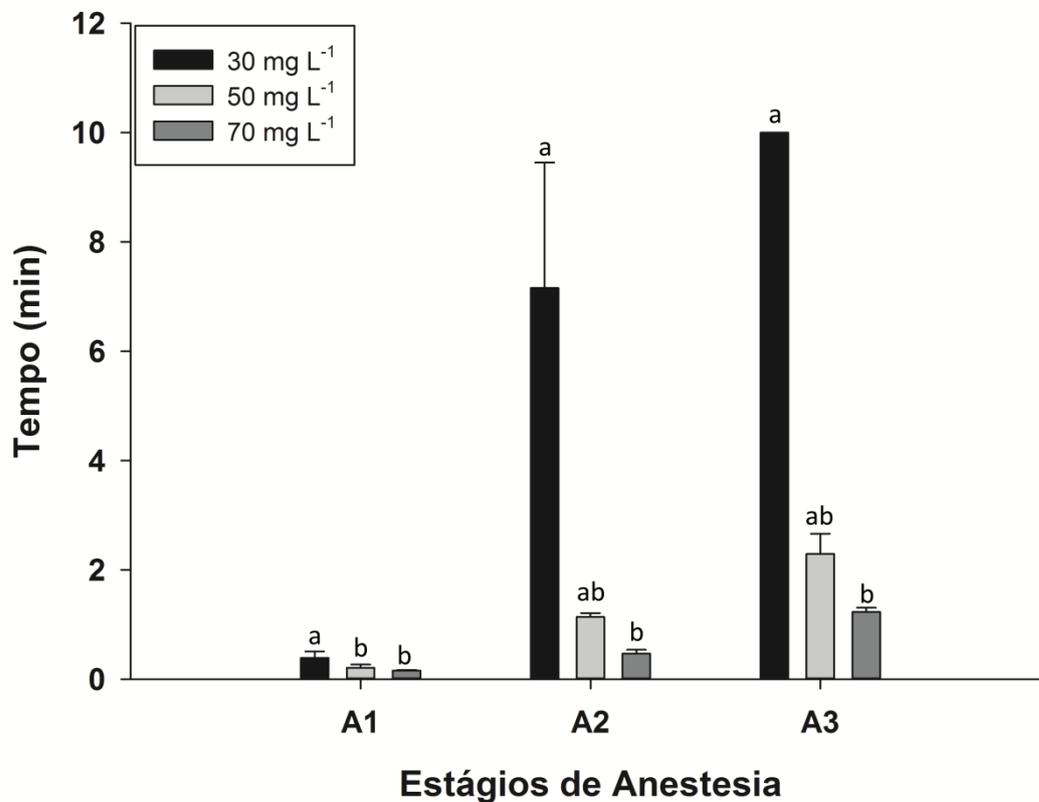
918 Todos os peixes passaram sucessivamente pelos três estágios de anestesia e se
919 recuperaram, atingindo o estágio R3 (Figuras 1 e 2). Os peixes expostos apenas ao
920 álcool foram monitorados durante 30 minutos e não apresentaram mudanças de

921 comportamento, suportando a ideia de que os resultados a seguir são consequência
922 apenas dos anestésicos testados.

923 A concentração de 30 mg L⁻¹ resultou em um maior tempo (P<0,05) para atingir
924 o estágio A3 (>10 min.) que a concentração de 70 mg L⁻¹ (1'30''). A concentração 50
925 mg L⁻¹ alcançou o estágio A3 em 2'30'', sendo semelhante a 30 e 70 mg L⁻¹ (P>0,05).

926 As concentrações de 30 e 50 mg L⁻¹ demoraram 2'30'' para alcançarem o
927 estágio R3, enquanto que 70 mg L⁻¹ obteve um tempo (>10 min.) significativamente
928 maior (P<0,05) que as demais concentrações.

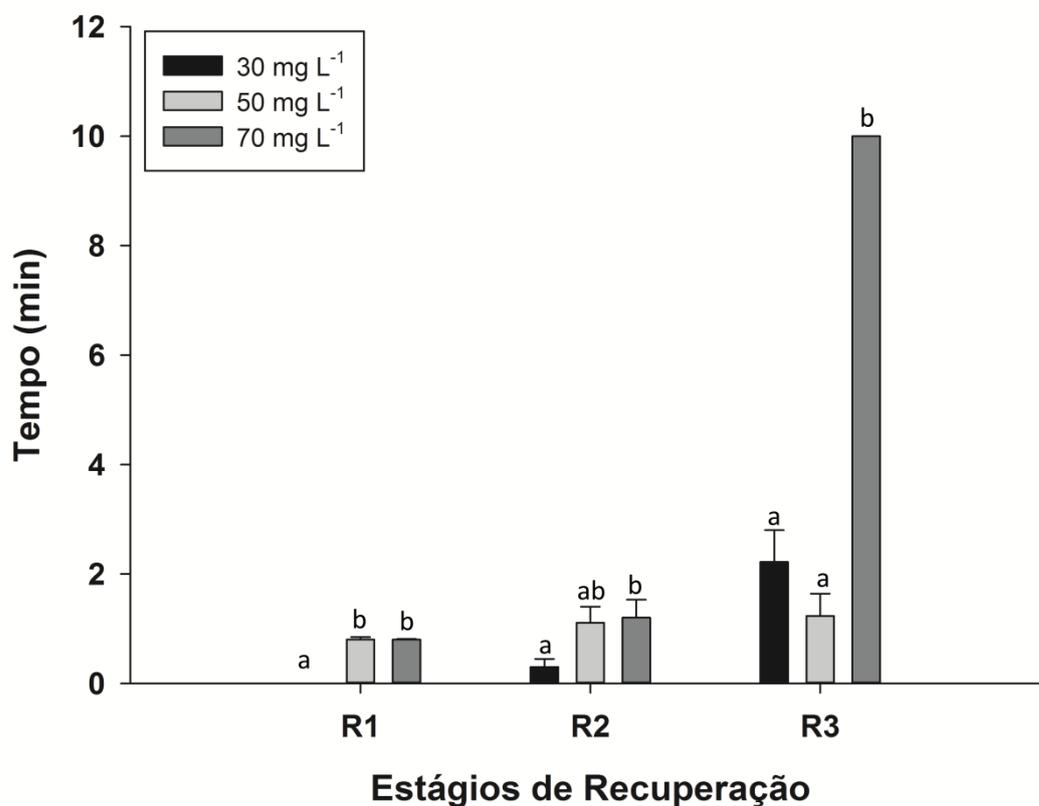
929



930

931 Figura 1: Tempo (média ± DP) em que juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*
932 atingiram os diferentes estágios de anestesia com o uso de benzocaína. Letras diferentes
933 indicam diferença significativa (P<0,05) para cada estágio de anestesia.

934



935

936 Figura 2: Tempo (média \pm DP) em que juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*
 937 atingiram os diferentes estágios de recuperação com o uso de benzocaína. Letras
 938 diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) para cada estágio de recuperação.

939

940 3.2. Experimento 2: Hematologia e estresse oxidativo

941

942 Após 24 h da exposição às concentrações 0, 30, 50 e 70 mg L⁻¹ de benzocaína,
 943 não foram encontradas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) para glicemia e hematócrito
 944 (Tab. 2).

945 Em relação à formação de proteína carbonil (Fig. 5), nas brânquias foram
 946 observados valores significativamente maiores ($P < 0,05$) para a concentração de 0 mg L⁻¹
 947 ¹, sendo que para 30 mg L⁻¹ os valores foram significativamente maiores ($P < 0,05$) que
 948 para 50 e 70 mg L⁻¹, que foram iguais entre si ($P > 0,05$). Já para o fígado, a concentração
 949 de 30 mg L⁻¹ demonstrou valores significativamente maiores ($P < 0,05$) que os outros
 950 tratamentos. Para o cérebro, a formação de proteína carbonil foi significamente maior
 951 ($P < 0,05$) para 0 e 30 mg L⁻¹ de benzocaína, sendo que para 50 e 70 mg L⁻¹ os valores
 952 não diferiram entre si ($P > 0,05$). No músculo, a formação de proteína carbonil foi maior

953 (P<0,05) para 0 mg L⁻¹, porém não diferiu de 30 mg L⁻¹. Para a concentração de 50 mg
 954 L⁻¹, os valores não diferiram (P>0,05) de 30 mg L⁻¹, no entanto foram
 955 significativamente maiores (P<0,05) que 70 mg L⁻¹.

956

957 Tabela 2: Níveis de glicemia e porcentagem de hematócrito (média ± DP) no sangue de
 958 juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* submetidos a três concentrações de
 959 benzocaína.

960

Benzocaína (mg L ⁻¹)	Glicemia (mg dL ⁻¹)	Hematócrito (%)
0	39,9 ± 19,6	28,7 ± 10,9
30	46 ± 12,5	32,2 ± 3,5
50	44,3 ± 10,3	30 ± 5,5
70	56,4 ± 9,0	32,9 ± 3,7

961

962 Também não foram observadas diferenças estatísticas (p>0,05) entre os
 963 tratamentos para a atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) nos tecidos
 964 cérebro e músculo (Tab. 3).

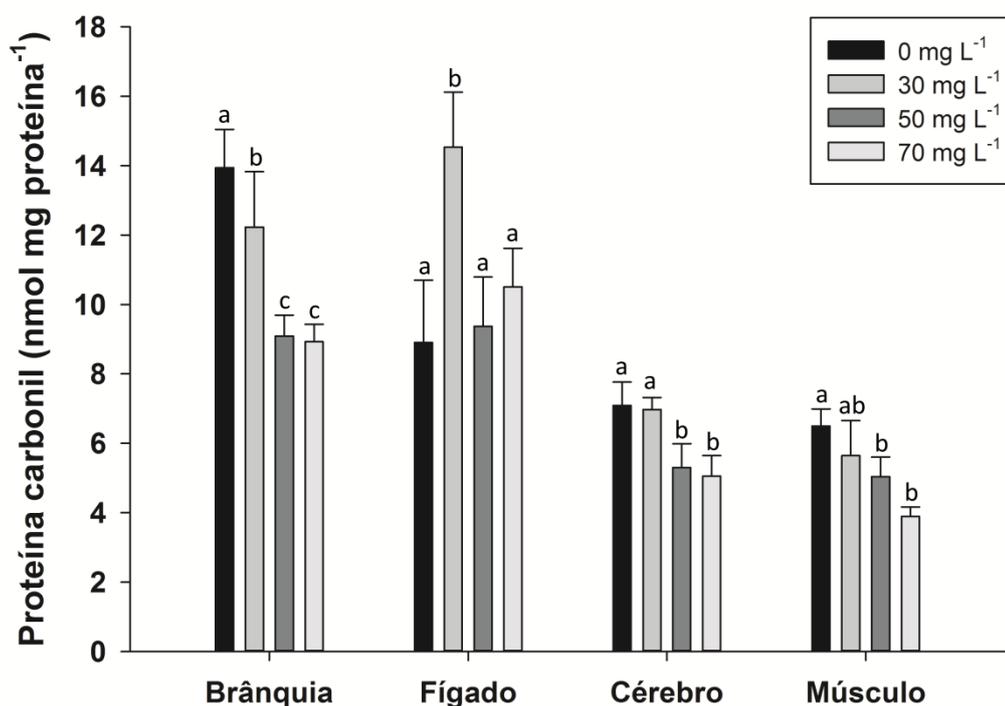
965

966 Tabela 3: Atividade de AChE (μmol AcSCh min⁻¹ mg⁻¹) (média ± DP) nos tecidos
 967 cérebro e músculo em bijupirá *Rachycentron canadum* submetidos a diferentes
 968 concentrações de benzocaína.

969

Benzocaína (mg L ⁻¹)	AChE
<i>Cérebro</i>	
0	0,37 ± 0,05
30	0,37 ± 0,05
50	0,37 ± 0,04
70	0,38 ± 0,04
<i>Músculo</i>	
0	0,20 ± 0,02
30	0,22 ± 0,04
50	0,23 ± 0,04
70	0,21 ± 0,02

970

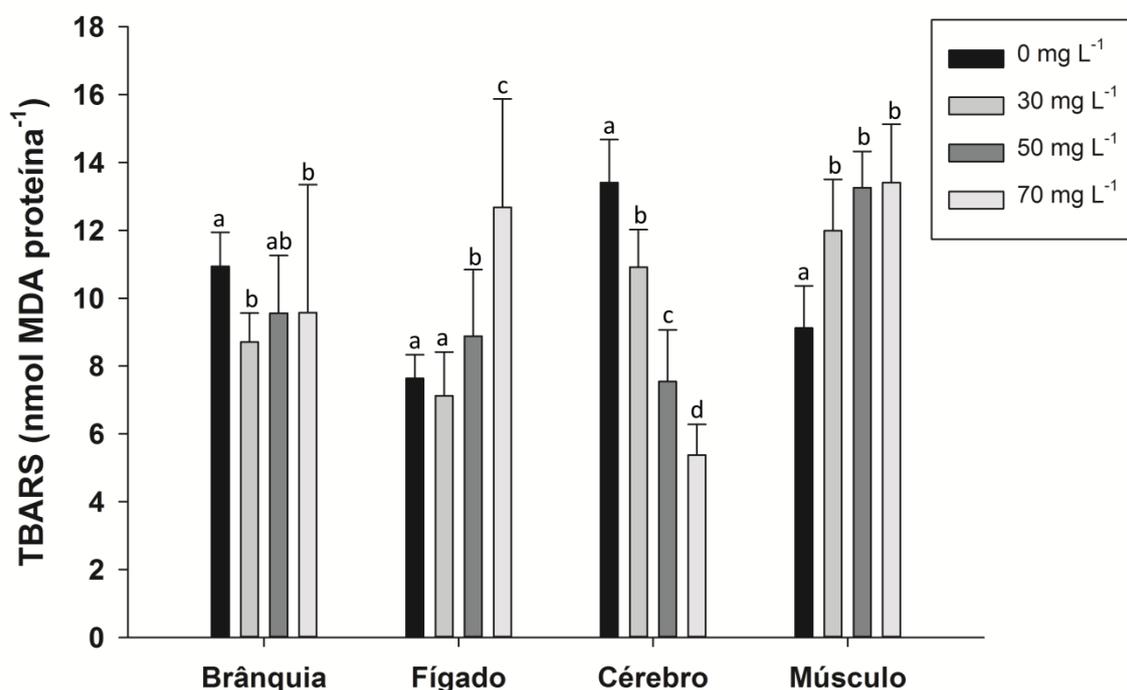


971

972 Figura 5: Níveis de proteínas carbonil nos tecidos de bijupirá *Rachycentron canadum*
 973 submetidos a três concentrações do anestésico benzocaína. Letras diferentes indicam
 974 diferença significativa ($P < 0,05$).

975

976 Os valores encontrados para a determinação de substâncias reativas ao ácido
 977 tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos se encontram na Figura 6. Nas brânquias os valores
 978 foram significativamente maiores ($P < 0,05$) para 0 mg L^{-1} , não diferindo apenas de 50
 979 mg L^{-1} , que não diferiu de 30 e 70 mg L^{-1} . Para o fígado, os valores observados para 70
 980 mg L^{-1} foram significativamente maiores ($P < 0,05$), sendo que 0 e 30 mg L^{-1} não
 981 diferiram entre si ($P > 0,05$). No cérebro, todos os tratamentos diferiram entre si
 982 ($P < 0,05$), sendo que o maior valor foi observado para 0 mg L^{-1} . O menor valor
 983 encontrado para o músculo foi no tratamento 0 mg L^{-1} , significativamente diferente dos
 984 outros tratamentos, que não diferiram entre si ($P > 0,05$).



985

986 Figura 6: Níveis de TBARS nos tecidos de bijupirá *Rachycentron canadum* submetidos
 987 a três concentrações do anestésico Benzocaína. Letras diferentes indicam diferença
 988 significativa ($P < 0,05$).

989

990 Os valores encontrados para a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e
 991 atividade das enzimas glutathiona-S-transferase (GST) e catalase (CAT) estão dispostos
 992 na Tabela 4. Não foram observadas diferenças na concentração de GSH no cérebro,
 993 porém sua concentração no fígado foi significativamente menor ($P < 0,05$) para 30 mg L⁻¹
 994 ¹ de benzocaína. A atividade enzimática de GST no cérebro foi significativamente maior
 995 ($P > 0,05$) para o tratamento 0 mg L⁻¹. Já no fígado, a atividade foi maior ($P < 0,05$) para o
 996 tratamento 30 mg L⁻¹, sendo ainda observado que na concentração de 50 mg L⁻¹, a
 997 atividade foi maior ($P < 0,05$) que para 0 e 70 mg L⁻¹ de benzocaína, que foram iguais
 998 entre si ($P > 0,05$). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos para
 999 atividade da enzima catalase.

1000

1001

1002 Tabela 4: Atividade da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona-S-transferase (GST) e da
 1003 catalase (CAT) nos tecidos brânquia e fígado em bijupirá *Rachycentron canadum*
 1004 submetidos a diferentes concentrações de benzocaína. Letras diferentes indicam
 1005 diferença significativa (P<0,05).

1006

Benzocaína (mg L ⁻¹)	GSH	GST	CAT
<i>Brânquia</i>			
0	0,024±0,007	1,650±0,29 a	1,61±0,45
30	0,019±0,004	0,552±0,13 b	1,59±0,3
50	0,018±0,005	0,657±0,17 b	1,62±0,5
70	0,021±0,003	0,628±0,12 b	1,60±0,58
<i>Fígado</i>			
0	0,386±0,09 a	0,493±0,12 a	1,10±0,6
30	0,177±0,10 b	1,287±0,31 b	1,11±0,45
50	0,343±0,07 a	0,787±0,20 c	1,09±0,55
70	0,348±0,14 a	0,383±0,106 a	1,09±0,54

1007 GSH e GST: $\mu\text{mol GS-DNB min mg}^{-1}$ PTN; CAT: $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína min^{-1} . Dados
 1008 representam a média \pm DP.

1009

1010 4. Discussão

1011

1012 4.1. Experimento 1: Avaliação dos estágios de anestesia e recuperação de juvenis de
 1013 bijupirá expostos a benzocaína

1014

1015 Marking e Meyer (1985) recomendaram que a anestesia profunda em peixes
 1016 deva ser atingida em até 3 min. e a recuperação não deva ultrapassar 5 min. O presente
 1017 estudo demonstrou que a 50 mg L⁻¹ de benzocaína, juvenis de bijupirá são anestesiados
 1018 e se recuperam dentro desses períodos.

1019 Fatores como espécie, peso e temperatura podem afetar o processo de anestesia
 1020 (Olsen et al., 1995; Tsantilas et al., 2006). Okamoto et al. (2009) observaram que a 50
 1021 mg L⁻¹ de benzocaína foi eficaz para anestésiar juvenis de *Trachinotus marginatus* (51
 1022 g), quando administrados a 19°C. Para *Salmo salar* (45 g), a concentração de 30 mg L⁻¹
 1023 de benzocaína, a 5°C, mostrou-se eficiente (Iversen et al., 2003), enquanto que para
 1024 juvenis de *Colossoma macropomum* (9 g), doses mais elevadas de benzocaína são
 1025 consideradas ideais (100 – 150 ppm) a 24°C (Gomes et al., 2001). Para juvenis de
 1026 bijupirá *R. canadum*, Gullian e Vilanueva (2009) recomendam o uso de 20 mg L⁻¹ do

1027 anestésico eugenol para procedimentos que requeiram imobilização de até 10 min, e 40
1028 mg L⁻¹ de triclaína metano sulfonato (MS222) para procedimentos com duração de até
1029 20 min.

1030

1031 4.2. Experimento 2: Hematologia e Estresse oxidativo

1032

1033 Índices bioquímicos e hematológicos são utilizados para avaliar o efeito de
1034 estressores em peixes. Um dos mais utilizados são concentração de glicemia e
1035 hematócrito (Svobodova et al., 1999). Gomes et al. (2001) verificaram níveis de
1036 glicemia entre 58 e 68 mg dL⁻¹ em juvenis de *C. macropomum* anestesiados em
1037 concentrações de benzocaína consideradas seguras, porém em concentrações acima de
1038 200 mg L⁻¹ estes níveis aumentaram, indicando que altas concentrações de benzocaína
1039 são estressantes para estes peixes. Trushenski et al. (2010) avaliaram a resposta de
1040 estresse de juvenis de bijupirá *R. canadum* e encontraram valores de até 189 mg dl⁻¹
1041 para glicemia após 1 h da exposição a um estressor, retornando aos níveis basais após
1042 24h. No presente trabalho, os valores de glicemia não apresentaram alterações 24 h após
1043 exposição à benzocaína. Bolasina (2006) observou um percentual de 29% no
1044 hematócrito em juvenis de *Urophycis brasiliensis* recém-anestesiados com 40 mg L⁻¹ de
1045 benzocaína e de 27% em peixes que não foram anestesiados, não havendo diferença
1046 entre os tratamentos, assim como ocorreu no presente trabalho.

1047 O estresse oxidativo causa o desequilíbrio de oxidantes e antioxidantes,
1048 conduzindo à ocorrência de danos celulares oxidativos (Barbosa et al., 2008).
1049 Anestésicos entram pelas brânquias dos peixes, principal local de transferência de
1050 xenobióticos, seguido pela distribuição por todo o organismo, com potencial efeito
1051 deletério aos demais órgãos (Valisek et al., 2011).

1052 Quando a atividade de AChE é inibida, há bloqueio na transmissão de impulsos
1053 nervosos, paralisando as funções vitais (Stenesh, 1998). No presente trabalho, a
1054 atividade de AChE parece não ter sido alterada pela exposição ao anestésico
1055 benzocaína, fato que pode ser um indicativo da ausência de distúrbios no sistema
1056 colinérgico dos peixes.

1057 A carbonilação de proteínas é o resultado da oxidação protéica que diminui a
1058 atividade catalítica nas enzimas, sendo a proteína carbonil o biomarcador mais
1059 amplamente aceito para avaliar os danos oxidativos às moléculas de proteína (Shacter et
1060 al., 1994; Almroth et al., 2008). No presente trabalho, os níveis de proteína carbonil

1061 foram maiores para a concentração de 30 mg L⁻¹ no fígado, indicando provável
1062 alteração oxidativa, interferindo na estrutura e função das proteínas (Sturve et al., 2008).
1063 Ao expor juvenis de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* a quatro anestésicos (óleo de
1064 cravo, propiscina, 2-fenoxietanol e MS222), Velisek et al. (2011) avaliaram
1065 biomarcadores de estresse oxidativo, observando aumento nos níveis de proteína
1066 carbonil para o cérebro após 24 h de exposição.

1067 O processo de peroxidação lipídica é uma sequência de reações bioquímicas
1068 definidas como deterioração oxidativa de ácidos graxos polinsaturados. A peroxidação
1069 lipídica em peixes é medida como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
1070 (TBARS), e tem sido utilizado como biomarcador em vários estudos (Roméo et al.,
1071 2005; Almroth et al., 2005; Barata et al., 2005). Para juvenis de bijupirá, quando
1072 comparamos ao tratamento 0 mg L⁻¹, se observa maiores níveis de TBARS para todas as
1073 concentrações no músculo, e para 50 e 70 mg L⁻¹ no fígado. O fígado é um órgão
1074 metabolicamente ativo com grande poder antioxidante, explicando os maiores níveis de
1075 TBARS nesse tecido (Velisek et al., 2011).

1076 O sistema de defesa antioxidante inclui enzimas como catalase (CAT),
1077 glutathione S-transferase (GST) e o tripeptídeo glutathione reduzida (GSH) (Monteiro et
1078 al., 2006). Estudos mostram que quando a atividade dessas enzimas se encontra alterada
1079 em peixes, pode ser um indicativo de alterações nas defesas antioxidantes a poluentes
1080 aquáticos (Cattaneo et al., 2010; Ferreira et al., 2010). No presente estudo, os níveis de
1081 atividade CAT não foram alterados nos tecidos analisados.

1082 No fígado, os níveis de GSH diminuíram para peixes expostos a 30 mg L⁻¹,
1083 enquanto que para GST houve um aumento para 30 e 50 mg L⁻¹. A enzima GST foi
1084 mais ativa no tecido hepático que nas brânquias, indicando o papel efetivo desse tecido
1085 na detoxificação (Basha e Rani, 2003). O aumento na atividade de GST no fígado
1086 ocorreu simultaneamente ao declínio de GSH para 30 mg L⁻¹. O GSH possui importante
1087 papel na detoxificação de eletrófilos e prevenção do estresse oxidativo celular
1088 (Sies, 1999). A redução de GSH durante a exposição à benzocaína 30 mg L⁻¹ se deve
1089 provavelmente a um aumento da utilização de GSH, que pode ser convertida a
1090 glutathione oxidada (GSSG), não ocorrendo regeneração de GSH pela glutathione redutase
1091 (GR). O GSH é uma das primeiras linhas de defesa contra o estresse oxidativo, e seus
1092 níveis podem aumentar devido a um mecanismo adaptativo que eleva sua síntese
1093 quando exposto a um estresse oxidativo moderado. No entanto, um estresse oxidativo
1094 elevado pode suprimir os níveis de GSH devido a uma perda nos mecanismos

1095 adaptativos e à oxidação de GSH a GSSG (Zhang et al., 2004). A diminuição nos níveis
1096 de GSH pode reduzir a habilidade celular de destruir radicais livres e EROs,
1097 aumentando assim o potencial oxidativo nas células (Elia et al., 2003). As células
1098 tentam remover os xenobióticos por conjugação direta com GSH ou utilizando GST, o
1099 que diminui os níveis de GSH. A enzima GST utiliza GSH para detoxificação, portanto
1100 a diminuição nos seus níveis provavelmente indica seu esgotamento pelo aumento na
1101 atividade da enzima GST. A relação entre as mudanças na atividade de GST e a redução
1102 nos níveis de GSH, indica que há uma restrição da atividade de GST pela
1103 indisponibilidade de GSH (Monteiro et al., 2006). Os níveis de GST também
1104 aumentam para 50 mg L⁻¹, porém os níveis de GSH permanecem semelhantes ao
1105 controle. Provavelmente o sistema antioxidante glutationa foi capaz de suportar a
1106 atividade da enzima GST, através da regeneração de GSH pela GR.

1107

1108 **5. Conclusões**

1109

1110 A ocorrência de períodos de anestesia e de recuperação considerados ideais, a
1111 não alteração de parâmetros hematológicos e as menores alterações de estresse
1112 oxidativo indicam o anestésico benzocaína como eficiente para juvenis de bijupirá *R.*
1113 *canadum*, quando administrado à concentração de 50 mg L⁻¹. Porém são necessárias
1114 maiores investigações sobre os mecanismos de estresse oxidativo, já que todas as
1115 concentrações mostraram alterações nos biomarcadores utilizados para sua avaliação.

1116

1117 **6. Referências bibliográficas**

1118

1119 Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout
1120 (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers.
1121 Aquatic toxicology 73, 171–80.

1122 Almroth, B.C., Sturve, J., Stephensen, E., Holth, T.F., Förlin, L., 2008. Protein
1123 carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from
1124 a heavy metal polluted and a PAH polluted site. Marine Environmental Research
1125 66, 271–77.

1126 Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme
1127 activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna*

1128 exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*
1129 C 140, 175–86.

1130 Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; Alfenas, R.C.G.; Paula, S.O.; Minin, V.P.R.; Bressan,
1131 J., 2008. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire: Revista da*
1132 *Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição* 33(2), 111–128.

1133 Basha, P.S., Rani, A.U., 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in
1134 freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and*
1135 *Environmental Safety* 56, 218–221.

1136 Bolasina, S.N., 2006. Cortisol and hematological response in Brazilian codling,
1137 *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment.
1138 *Aquaculture International* 14, 569–575.

1139 Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., Menezes, C.C., Moraes, B., Santi, A., Toni, C.,
1140 Avila, L.A., Zanella, R., 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio*
1141 exposed to the herbicide penoxsulam in rice field conditions. *Journal of Applied*
1142 *Toxicology* 31, 626-632.

1143 Cnaani, A., Mclean, E., 2009. Time-course response of cobia (*Rachycentron canadum*)
1144 to acute stress. *Aquaculture* 289, 140-142.

1145 Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein
1146 carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23–
1147 38.

1148 Elia, A. C., Galarini, R., Taticchi, M. I., Dörr, A. J. M., & Mantilacci, L. (2003).
1149 Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury
1150 exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(2), 162–167.

1151 Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*
1152 82, 70-77.

1153 Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., 1961. A new and rapid colorimetric
1154 determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-
1155 95.

1156 Ferreira, D., Motta, A.C, Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010.
1157 Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals.
1158 *Chemosphere* 79, 914–921.

1159 Gomes, L.C., Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Roubach, R., Araujo-Lima,
1160 C.A.R.M., 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui

1161 *Colossoma macropomum*. Journal of the World Aquaculture Society 32(4), 426-
1162 431.

1163 Gullian, M., Villanueva, J., 2009. Efficacy of tricaine methanesulphonate and clove oil
1164 as anaesthetics for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture Research
1165 40, 852–860.

1166 Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first
1167 enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal Biology Chemistry 249,
1168 7130-7139

1169 Halliwell, B., 2001. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: Nature
1170 Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, 1-7.

1171 Holloway, A.C, Keene, J.L., Noakes, D.G., Moccia, R.D., 2004. Effects of clove oil and
1172 MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*,
1173 Walbaum. Aquaculture Research 35, 1025-1030.

1174 Holt, G.J., Faulk, C.K., Schwarz, M.H., 2007. A review of the larviculture of cobia
1175 *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. Aquaculture 268, 181-187.

1176 Inoue, L.A.K.A., Santos Neto, C., Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for
1177 juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). Ciência Rural 33(5), 943-
1178 947.

1179 Iversen, M., Finstad, B., Mckinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of
1180 metomidate, clove oil, Aqui-STM and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic
1181 salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity.
1182 Aquaculture 221, 549-566.

1183 King, W., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C., Berlinsky, D.L., 2005. The use of
1184 clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for
1185 inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea
1186 bass (*Centropristis striata* L.). Aquaculture Research 36, 1442-1449.

1187 Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Pascariello, M.F., Marinosci, L.,
1188 Schettino, T, 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and
1189 antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*
1190 in an Italian coastal marine area. Marine Pollution Bulletin 46, 324–330.

1191 Marking, L.L., Meyer, F.P., 1985. Are better fish anesthetics needed in fisheries?
1192 Fisheries 10, 2-5.

1193 Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel
1194 mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement

1195 of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional*
1196 *Biochemistry* 16, 577-586.

1197 Miron, D., Crestani, M., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno,
1198 M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone,
1199 quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver
1200 catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicology and Environmental*
1201 *Safety* 61, 398-403.

1202 Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress
1203 biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to
1204 organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative*
1205 *Biochemistry and Physiology C* 143, 141–149.

1206 Nelson, D.P., Kiesov, L.A, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by
1207 catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV).
1208 *Analytical Biochemistry* 49, 474-478.

1209 Nemcsok, J., Nemeth, A., Buzas, Z.S., Boross, L., 1984. Effects of copper, zinc and
1210 paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic*
1211 *Toxicology* 5, 23-31.

1212 Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by
1213 thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351-358.

1214 Okamoto, M.H., Tesser, M.B, Louzada, L.R., Santos, R.A., Sampaio, L.A., 2009.
1215 Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus*
1216 *marginatus*. *Ciência Rural* 39(3), 866-870.

1217 Olsen, Y.A., Einarsdottir, I.E., Nilssen, K.J., 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic
1218 salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*
1219 134, 155-168.

1220 Oruç, E.O., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity
1221 potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental*
1222 *Toxicology and Pharmacology* 23, 48–55.

1223 Park, M.O., Hur, W.J., Im, S.Y., Seol, D.W., Lee, J., Park, I.S., 2008. Anaesthetic
1224 efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper
1225 *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research* 39, 877-884.

1226 Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to
1227 oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch).
1228 *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 112-117.

- 1229 Requena, J.R., Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2003. Recent advances in the analysis of
1230 oxidized proteins. *Amino Acids* 25, 221–226.
- 1231 Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J., 2000. Cadmium
1232 and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of
1233 the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48, 185–194.
- 1234 Roubach, R., Gomes, L.C., Fonseca, F.A.L., Val, A.L., 2005. Eugenol as an efficacious
1235 anaesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture*
1236 *Research* 36, 1056-1061.
- 1237 Shacter, E., Williams, J.A., Lim, M., Levine, R.L., 1994. Differential susceptibility of
1238 plasma proteins to oxidative modification: examination by western
1239 blot immunoassay. *Free Radical Biology & Medicine* 17(5), 429–437.
- 1240 Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology &*
1241 *Medicine* 27, 916–921.
- 1242 Small, B.C., 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma
1243 cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil
1244 anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218, 177-185.
- 1245 Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*. Nova Iorque, W. H. Freeman and Company.
1246 887 pp.
- 1247 Stefano, B., Ilaria, C., Silvano, F., 2008. Cholinesterase activities in the scallop *Pecten*
1248 *jacobaeus*: Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants.
1249 *Science of the Total Environment* 392, 99-109.
- 1250 Sturm, A., da Silva de Assis, H.C, Hansen, P.-D., 1999. Cholinesterases of marine
1251 teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of
1252 neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 47, 389–398.
- 1253 Sturv, J., Almroth, B.C., Forlin, L., 2008. Oxidative stress in rainbow trout
1254 (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent.
1255 *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 446–452.
- 1256 Svobodova, Z., Kalab, P., Dusek, B., Vykusova, B., Kolarova, J., Janouskova, D., 1999.
1257 The effect of handling and transport on the concentration of glucose and cortisol
1258 in blood plasma of common carp. *Acta Veterinaria Brno* 68, 265–274.
- 1259 Trushensky, J., Schwarz, M., Takeuchi, R., Delbos, B., Sampaio, L.A., 2010.
1260 Physiological responses of cobia *Rachycentrom canadum* following exposure to
1261 low water and air exposure stress challenges. *Aquaculture* 307, 173-177.

- 1262 Tsantilas, H., Galatos, A.D., Athanassopoulou, F., Prassinos, N.N., Kousoulaki, K.,
1263 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white
1264 sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C.
1265 Aquaculture 253, 64-70.
- 1266 Velisek, J., Stara, A., Li, Z.H., Silovska, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects
1267 of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers
1268 in rainbow trout. Aquaculture 310, 369–375.
- 1269 Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews 77,
1270 591-625.
- 1271 Webb Jr., K.A., Hitzfelder, G.M., Faulk, C.K., Holt, G.J., 2007. Growth of juvenile
1272 cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating
1273 aquaculture system. Aquaculture 264, 223-227.
- 1274 Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O.B., Olsen, R.E., 2010. Anesthesia induces stress
1275 in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic
1276 halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Fish physiology and biochemistry 36(3),
1277 719-30.
- 1278 Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2004. Effects of chronic exposure of
1279 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius*
1280 *auratus*. Chemosphere 55, 167–74.
- 1281

1282 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
1283 INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
1284 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

1285

1286

1287

1288

1289

1290

CAPÍTULO II

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297

1298 **Avaliação do estresse no transporte de juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*:**

1299 **efeito do anestésico benzocaína e diferentes densidades**

1300

1301 **Resumo**

1302

1303 Foram realizados dois experimentos para avaliar a resposta do estresse no transporte de
1304 juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*. Os peixes foram embalados em sacos de
1305 polietileno de 60 L, contendo 10 L de água do mar e 30 L de oxigênio. Os sacos foram
1306 acondicionados em caixas de isopor e todos tratamentos foram realizados com três
1307 repetições, com duração de 8 h. O primeiro experimento (peixes com peso médio de
1308 30,9 g, densidade de 10 g L⁻¹) avaliou o efeito da benzocaína durante o transporte. Três
1309 peixes foram embalados em cada saco. Foram avaliadas duas concentrações de
1310 benzocaína, 2 e 6 mg L⁻¹, e mais um tratamento isento do anestésico. Para avaliação dos
1311 parâmetros hematológicos (glicose e hematócrito), foram coletadas amostras de sangue
1312 antes da embalagem (controle), 0 (imediatamente após o transporte), 2, 24 e 48 h depois
1313 do transporte. No segundo experimento, os peixes (37,5 g) foram embalados nas
1314 densidades de 10, 20 e 30 g L⁻¹ e os parâmetros hematológicos (glicose, hematócrito e
1315 osmolalidade) foram medidos anteriormente ao transporte (controle), 0, 2 e 24 h após o
1316 final do transporte. Para ambos os experimentos, foram coletadas amostras de água para
1317 medição do pH e concentrações de oxigênio dissolvido, amônia e CO₂. Não foi
1318 observada mortalidade no experimento com adição de benzocaína. No tempo 0 h, a
1319 glicemia foi maior para 6 mg L⁻¹ (P<0,05) de benzocaína, embora em 48 h já tenha
1320 retornado a valores similares ao controle. Foi observada mortalidade de 39,5% dos
1321 peixes na densidade de 30 g L⁻¹. A concentração de CO₂ foi significativamente maior
1322 (P<0,05) na densidade de 30 g L⁻¹ (61 ± 10,5 mg CO₂ L⁻¹) que em 10 e 20 g L⁻¹ (19 ±
1323 3,7 e 35 ± 4,9 mg CO₂ L⁻¹). A glicemia na densidade de 30 g L⁻¹ foi maior (P<0,05) que
1324 nos outros tratamentos. No entanto, retornou a valores próximos ao controle apenas para
1325 20 e 30 g L⁻¹ depois de 24 h. Os resultados sugerem que: i) não há vantagem no uso de
1326 benzocaína no transporte de juvenis de bijupirá; e ii) juvenis de bijupirá não devem ser
1327 transportados por 8 h em densidades maiores que 20 g L⁻¹.

1328

1329 **Abstract**

1330

1331 Two experiments were conducted to evaluate the stress response during transportation
1332 of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. The fish were packed in polyethylene bags
1333 with 10 L of salt water and 30 L of oxygen. The bags were packed in styrofoam boxes
1334 and all treatments were conducted in triplicate and lasted for 8 h. The first experiment
1335 (average weight of 30.9 g, density 10 g L⁻¹) evaluated the benzocain effect during
1336 transportation. Three fish were packed in which bag. Two concentrations were
1337 evaluated, 2 and 6 mg L⁻¹, and a control group without anesthetic. To evaluate
1338 hematological parameters (glucose and hematocrit), blood samples were collected from
1339 the fish before transportation, 0 (immediately after transport), 2, 24 and 48 h after
1340 transport. In the second experiment, the fish (35.7 g) were packed at the densities 10, 20
1341 and 30 g L⁻¹ and hematological parameters (glucose, hematocrit and osmolality) were
1342 measured before transport (controle), 0, 2 and 24 h after the end of transportation. For
1343 both experiments, water samples were collected to verify oxygen, pH, ammonia and
1344 CO₂. No mortality was observed in the experiment with benzocaine. Glucose at 0 h was
1345 higher (P<0,05) for 6 mgL⁻¹ benzocaine, although at 48 h the level was similar to
1346 control. Mortality of 39.5% was observed at the density 30 g L⁻¹. The CO₂ was
1347 significantly higher (P<0.05) at the density 30 g L⁻¹ (61 ± 10.5 mg CO₂ L⁻¹) than at 10
1348 and 20 g L⁻¹ (19 ± 3.7 and 35 ± 4.9 mg CO₂ L⁻¹). Glucose at the density of 30 g L⁻¹ was
1349 higher (P<0,05) than in the other treatments. Nevertheless, the glucose returned to the
1350 control level just at 20 and 30 g L⁻¹ after 24 h. The results suggest that: i) there is no
1351 advantage in using benzocaine for transporting juvenile cobia; and ii) juvenile cobia
1352 should not be transported for 8 h at densities exceeding 20 g L⁻¹.

1353

1354 **1. Introdução**

1355

1356 A aquicultura é uma atividade que envolve estresse em peixes. Manejo,
1357 transporte, quedas na qualidade da água e alta densidade de estocagem são alguns
1358 fatores estressantes comuns na piscicultura, podendo ter como consequências, baixo
1359 desempenho no crescimento, patologias e até mesmo mortalidades (Paterson et al.,
1360 2003; Small, 2003; Ashley, 2006; Sulikowski et al., 2006).

1361 O transporte de peixes é um dos principais problemas em aquicultura (Amend et
1362 al., 1982; Schreck et al., 1995; Azambuja et al., 2011). Considerado um procedimento
1363 que expõe os peixes a uma série de estímulos adversos, é responsável por desencadear
1364 uma série de respostas fisiológicas, sendo reconhecido como um estressor fisiológico
1365 potencial (Iversen et al., 1998; Cooke et al., 2004; Urbinati et al., 2004; Chandroo et al.,
1366 2005). Como resposta fisiológica, ocorre a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-
1367 interrenal (HPI), resultando em um aumento no nível de catecolaminas e cortisol no
1368 sangue, o que provoca o aumento da glicemia e da concentração de hemoglobina no
1369 sangue, além de distúrbio no balanço hidromineral, entre outros fatores (Barton, 1991;
1370 Wandelaar Bonga, 1997).

1371 Alguns trabalhos mostram que o estresse dos peixes, causado pelo transporte,
1372 pode ser minimizado com a utilização de anestésicos, assim como o emprego de uma
1373 densidade de estocagem adequada (Carneiro et al., 2002; Gomes et al., 2003; Ross et
1374 al., 2007; Colburn et al., 2008; Iversen et al., 2009).

1375 O bijupirá, *Rachycentron canadum*, é um peixe costeiro, pelágico, migratório,
1376 único membro da família Rachycentridae. Essa espécie está amplamente distribuída nos
1377 oceanos tropicais e subtropicais, exceto na costa leste do Oceano Pacífico (Shaffer e
1378 Nakamura, 1989) e na costa Atlântica da Europa. Considerada uma espécie promissora
1379 para a aquicultura, o bijupirá demonstra rápido crescimento, elevada sobrevivência na
1380 fase de juvenil e engorda, alta eficiência alimentar e carne de boa qualidade (Webb Jr. et
1381 al., 2007). Devido ao recente interesse em sua criação, ainda há pouco conhecimento
1382 sobre sua adaptação às práticas de manejo em aquicultura (Holt et al., 2007; Cnaani e
1383 McLean 2009).

1384 O objetivo desse trabalho foi avaliar o estresse causado pelo transporte em
1385 juvenis de bijupirá submetidos a diferentes concentrações do anestésico benzocaína e a
1386 diferentes densidades de estocagem.

1387

1388 **2. Material e Métodos**

1389

1390 *2.1. Experimento 1: Uso de benzocaína no transporte de bijupirá*

1391

1392 Para a realização deste experimento, foram utilizados 114 juvenis de bijupirá
1393 ($30,9 \pm 9,3$ g; $17,3 \pm 2,0$ cm) provenientes da fazenda comercial Redemar Alevinos,
1394 Ilhabela, São Paulo, Brasil. Os juvenis foram criados durante sete semanas em sistema
1395 de recirculação de água no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha – FURG,
1396 em tanques de 300 L. A temperatura da água permaneceu em $26,5$ °C e a salinidade em
1397 $30,0$. Durante esse período, os peixes foram alimentados 3 vezes ao dia com ração
1398 comercial INVE (57% Proteína bruta) e 18 h antes do transporte, os peixes foram
1399 mantidos em jejum.

1400 O transporte foi feito em sacos plásticos com volume de 60 L, sendo um terço do
1401 seu volume preenchido com água e o restante com oxigênio. Os sacos foram colocados
1402 em caixas de isopor (cinco sacos por caixa) para manutenção da temperatura. A
1403 estocagem nos sacos plásticos teve duração de 8 h, sendo que pelo período de 1:30 h, as
1404 caixas de isopor foram efetivamente transportadas em uma caminhonete.

1405 As concentrações de benzocaína utilizadas no transporte foram de 2 e 6 mg L⁻¹. A
1406 solução estoque de benzocaína (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos
1407 LTDA) foi preparada a partir da diluição em álcool comercial (96%), na proporção 1:9
1408 (p:v). Também foram avaliados peixes transportados em sacos isentos do anestésico (0
1409 mg L⁻¹).

1410 Anteriormente ao transporte, foram amostrados nove peixes diretamente dos tanques
1411 de criação para coleta de sangue, denominado tratamento Controle. O sangue foi
1412 coletado junto ao pedúnculo caudal, com auxílio de seringa heparinizada de 1 ml e
1413 agulha hipodérmica de 26G ½”. As amostras de sangue foram utilizadas para
1414 verificação de glicose (glicosímetro Accu Cheek Advantage) e hematócrito (centrífuga
1415 micro-hematócrito Micro Spin, 10 min., 12000 rpm).

1416 Foram utilizados três sacos por tempo e por tratamento, contendo três peixes em
1417 cada saco, além de três sacos adicionais sem peixes para o controle de qualidade da
1418 água. Apenas para o controle 48 h o experimento foi realizado em duplicata. Ao final
1419 das 8h de transporte, foi coletado sangue dos peixes de três sacos de cada tratamento
1420 (tempo 0 h). Os peixes dos sacos restantes foram desembalados e mantidos em tanques
1421 de 50 L (foi utilizado um tanque para cada saco) para coleta de sangue 2, 24 e 48 h após

1422 o transporte. Também ao final do transporte, foram coletadas amostras de água para
1423 verificação dos níveis de oxigênio, dióxido de carbono (CO₂), amônia e pH (Controle
1424 Água). A sobrevivência dos peixes foi observada durante todo o período experimental.

1425

1426 *2.2. Experimento 2: efeito da densidade de estocagem no transporte de bijupirá*

1427

1428 Para realização desse experimento, foram utilizados 162 juvenis de bijupirá
1429 (35,7 ± 7,5 g; 19,2 ± 2,8 cm) provenientes de fazenda comercial Aquatec,
1430 Canguaretama, Rio Grande do Norte, Brasil. Os peixes foram criados no Laboratório de
1431 Piscicultura Estuarina e Marinha – FURG durante seis semanas, como descrito no
1432 Experimento 1.

1433 As etapas de embalagem, tempo de transporte e coleta de sangue foram
1434 realizadas como descrito anteriormente. As densidades de estocagem avaliadas foram de
1435 10, 20 e 30 g L⁻¹ (3, 6 e 9 peixes por saco, respectivamente), sendo utilizados nove
1436 sacos por tratamento.

1437

1438 *2.3. Análise estatística*

1439

1440 A análise estatística dos parâmetros de qualidade de água foi feita por Análise de
1441 Variância (ANOVA) uma via. Para os parâmetros hematológicos, também foi feita
1442 Análise de Variância (uma via), em relação aos tempos e aos tratamentos. Foi utilizado
1443 o Teste de Tukey quando encontradas diferenças significativas e todas as análises foram
1444 feitas com nível de significância de 95%. Foi empregado o teste não-paramétrico de
1445 Kruskal-Wallis quando as exigências para a realização da ANOVA não foram supridas
1446 (Sokal e Rohlf, 1995).

1447

1448 **3. Resultados**

1449

1450 *3.1. Uso de benzocaína no transporte de bijupirá*

1451

1452 Não houve mortalidade durante e após o transporte.

1453 Os valores encontrados para os parâmetros de qualidade da água após as 8h de
1454 transporte encontram-se na Tabela 1. Os níveis de oxigênio dissolvido nos tratamentos
1455 0, 2 e 6 mg L⁻¹ foram significativamente menores (P<0,05) que no Controle Água. No

1456 tratamento com 6 mg L⁻¹, o nível de OD foi superior ao tratamento com 2 mg L⁻¹
1457 (P<0,05), porém ambos não diferiram significativamente do tratamento sem anestésico
1458 (P>0,05).

1459 Apenas no tratamento com 2 mg L⁻¹ o pH baixou significativamente (P<0,05)
1460 em relação ao controle, não havendo diferença significativa (P>0,05) entre os demais
1461 tratamentos.

1462 As concentrações de CO₂ foram maiores no tratamento com 2 mg L⁻¹ de
1463 benzocaína, quando comparadas com o tratamento sem anestésico (P<0,05). Em ambos
1464 os tratamentos, não houve diferença significativa (P>0,05) na concentração de CO₂, em
1465 comparação ao tratamento com 6 mg L⁻¹. Todos os tratamentos apresentaram valores de
1466 CO₂ superiores ao Controle (P<0,05).

1467 Em relação às concentrações de amônia total, o tratamento 2 mg L⁻¹ resultou em
1468 maiores valores, sendo significativamente maior (P<0,05) que os tratamentos 0 e 6 mg
1469 L⁻¹, que não diferiram entre si. Para amônia gasosa, não foi encontrada diferença entre
1470 os tratamentos.

1471 Os valores encontrados para glicemia e hematócrito após as 8h de transporte
1472 estão na Tabela 2. Para glicemia (Fig. 1), imediatamente após o transporte foi observado
1473 maiores valores no tratamento 6 mg L⁻¹ (P<0,05), enquanto não houve diferença
1474 significativa entre os tratamentos 0 e 2 mg L⁻¹ (P>0,05). Após 2 h da chegada do
1475 transporte, os valores no tratamento 6 mg L⁻¹ permaneceram maiores que no tratamento
1476 0 mg L⁻¹ (P<0,05), porém em ambos não diferiram dos valores observados no
1477 tratamento 2 mg L⁻¹. Até 2 h após o transporte todos os peixes apresentaram glicemia
1478 superior aos peixes que não foram transportados (Controle) (P<0,05). Passadas 24 h
1479 houve uma redução na glicemia em todos os tratamentos (P<0,05), porém não houve
1480 diferença significativa entre eles (P>0,05) e todos ainda permaneceram superiores ao
1481 Controle (P<0,05). Após 48h, a glicemia em todos os tratamentos permaneceu
1482 semelhante (P>0,05), porém apenas o tratamento 6 mg L⁻¹ atingiu os mesmos níveis do
1483 Controle (P>0,05).

1484

1485 Tabela 1: Parâmetros de qualidade da água medidos imediatamente após 8h de
1486 transporte (média ± DP) de juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* nos grupos
1487 Controle Água, 0 mg L⁻¹ (isento de anestésico) e anestesiados com 2 e 6 mg L⁻¹ de
1488 benzocaína. Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05).

1489

Parâmetros	Benzocaína (mg L ⁻¹)			
	Controle Água	0	2	6
OD (mg L ⁻¹)	24,4 ± 0,43 a	17,57 ± 3,15 bc	17,33 ± 3 b	20,37 ± 1,96 c
pH	8,31 ± 0,06 a	7,19 ± 0,19 a	6,92 ± 0,08 b	7,03 ± 0,08 ab
CO ₂ (mg L ⁻¹)	0 ± 0,58 a	7 ± 3,77 b	13 ± 2,44 c	10,5 ± 1,98 bc
TAN (mg L ⁻¹)	0,08 ± 0,02 a	0,96 ± 0,88 ab	2,46 ± 0,42 b	1,28 ± 0,63 a
NH ₃ -N (mg L ⁻¹)	0,006 ± 0,001 a	0,007 ± 0,005 a	0,008 ± 0,001 a	0,006 ± 0,002 a

1490

1491 Tabela 2: Níveis de glicemia e hematócrito (média ± DP) no sangue de juvenis de
 1492 bijupirá *Rachycentron canadum* após o transporte em diferentes concentrações de
 1493 benzocaína. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (P<0,05) entre
 1494 os diferentes tratamentos em cada intervalo de tempo e letras maiúsculas diferentes
 1495 indicam diferença significativa (P<0,05) do mesmo tratamento em diferentes intervalos
 1496 de tempo.

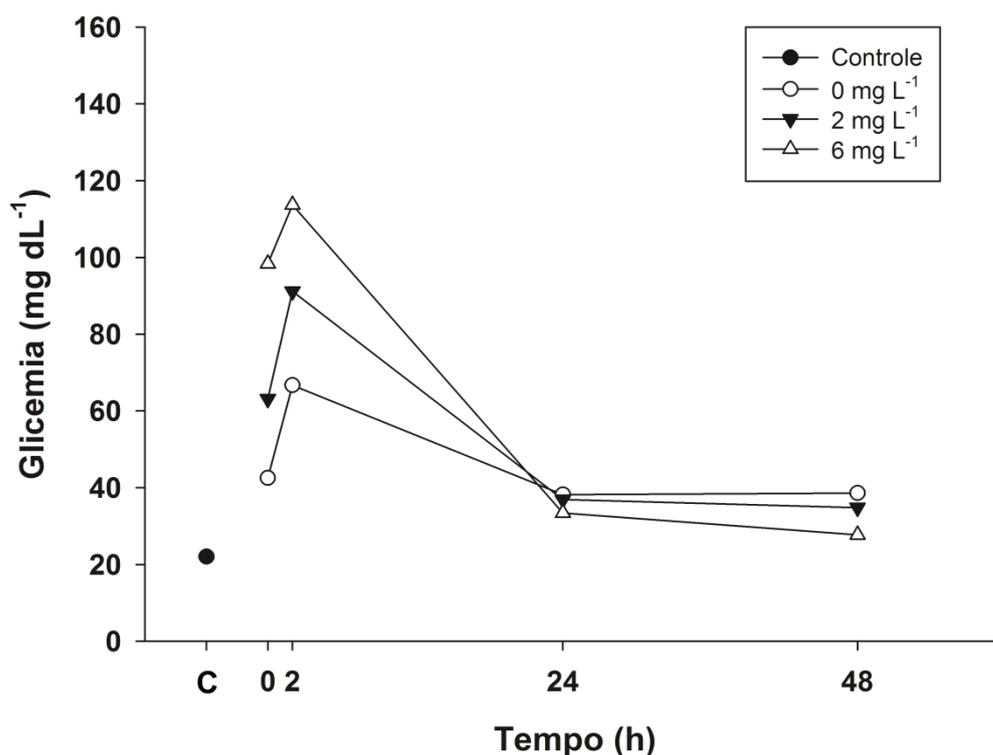
1497

	Benzocaína (mg L ⁻¹)	Antes do Transporte	Tempo após o transporte (h)			
			Controle	0	2	24
Glicemia (mg dL ⁻¹)	0	22,9 ± 4,6 aA	42,5 ± 10,1 bB	66,7 ± 37,4 bB	38,2 ± 3,8 bAB	38,6 ± 17,6 bAB
	2		63,1 ± 19,2 bB	91,2 ± 31,5 bcC	36,9 ± 4,1 bD	34,8 ± 6,8 bD
	6		98,4 ± 43,9 cB	113,7 ± 27,7 cB	33,4 ± 6,4 bA	27,7 ± 7,2 abA
Hematócrito (%)	0	29,1 ± 7,5	30,6 ± 4,7	27,5 ± 5,4	28,7 ± 4,1	31,2 ± 6,8
	2		29,1 ± 2,5	24,4 ± 2,1	27,6 ± 3,6	30,6 ± 4,9
	6		26,1 ± 3,3	25,8 ± 3,7	28,1 ± 3,3	29,5 ± 6,8

1498

1499 Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) para os valores de
 1500 porcentagem de hematócrito entre os tempos ou entre os tratamentos.

1501



1502

1503 Figura 1: Resposta de glicemia (mg dL⁻¹) de juvenis de *Rachycentron canadum* após 8 h
1504 de transporte em diferentes concentrações de benzocaína.

1505

1506 3.3. Efeito da densidade de estocagem no transporte de bijupirá

1507

1508 A sobrevivência nas densidades de 10 e 20 g L⁻¹ foi de 100%, enquanto que na
1509 densidade de 30 g L⁻¹ a sobrevivência foi de 60,5%, significativamente menor (P<0,05)
1510 que nas outras densidades.

1511 Os valores encontrados para os parâmetros de qualidade da água após 8h de
1512 transporte estão na Tabela 3. As concentrações de oxigênio dissolvido e CO₂ foram
1513 significativamente diferentes (P<0,05) nas três densidades utilizadas. Enquanto a
1514 concentração de OD diminuiu com o aumento da densidade, o contrário ocorreu com a
1515 concentração de CO₂. Os valores de pH foram significativamente diferentes (P<0,05)
1516 entre todos os tratamentos, diminuindo conforme foi aumentando a concentração de
1517 CO₂.

1518 Em relação às concentrações de amônia total, não houve diferença significativa
1519 nas densidades de 20 e 30 g L⁻¹ (P>0,05) e em ambas resultaram valores superiores à
1520 densidade de 10 g L⁻¹ (P<0,05). Nas três densidades as concentrações de TAN foram

1521 superiores ao Controle ($P < 0,05$). Para amônia gasosa, em todas as densidades foram
 1522 significativamente menores que o controle ($P < 0,05$) e não diferiram entre si ($P > 0,05$).

1523

1524 Tabela 3: Parâmetros de qualidade da água medidos após 8h de transporte (média \pm DP)
 1525 de juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* em diferentes densidades. Letras
 1526 diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

1527

Parâmetros	Densidade (g L^{-1})			
	Controle Água	10	20	30
OD (mg L^{-1})	22,38 \pm 1,52 a	15,77 \pm 2,28 b	9,94 \pm 1,83 c	6,48 \pm 1,85 d
pH	8,06 \pm 0,03 a	6,93 \pm 0,09 b	6,63 \pm 0,06 c	6,38 \pm 0,09 d
CO ₂ (mg L^{-1})	1 \pm 0 a	19 \pm 3,77 b	35 \pm 4,95 c	61 \pm 10,48 d
TAN (mg L^{-1})	0,18 \pm 0,04 a	1,02 \pm 0,67 a	3,00 \pm 1,30 b	4,14 \pm 0,81 b
NH ₃ -N (mg L^{-1})	0,007 \pm 0,001 a	0,003 \pm 0,001 b	0,004 \pm 0,002 b	0,004 \pm 0,001 b

1528

1529 Os valores encontrados para os parâmetros hematológicos glicemia, hematócrito e
 1530 osmolalidade após as 8h de transporte encontram-se na Tabela 4. Para glicemia (Fig. 2),
 1531 imediatamente após a chegada do transporte, foram observados os maiores valores para
 1532 a densidade de 30 g L^{-1} , sendo significativamente maiores ($P < 0,05$) que o Controle
 1533 (coletados antes do transporte) e não diferindo de 10 e 20 g L^{-1} ($P > 0,05$). Duas horas
 1534 após a chegada, a densidade de 30 g L^{-1} continuou com valores elevados e
 1535 significativamente maiores que no Controle ($P < 0,05$), não diferindo apenas de 20 g L^{-1}
 1536 ($P > 0,05$). Passadas 24 h do retorno, apenas na densidade de 10 g L^{-1} a glicemia era
 1537 superior a do Controle ($P < 0,05$).

1538

1539 Tabela 4: Níveis de glicemia e hematócrito (média \pm DP) no sangue de juvenis de
 1540 bijupirá *Rachycentron canadum* após o transporte em diferentes concentrações de
 1541 benzocaína. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre
 1542 os diferentes tratamentos em cada intervalo de tempo e letras maiúsculas diferentes

1543 indicam diferença significativa ($P < 0,05$) do mesmo tratamento em diferentes intervalos
 1544 de tempo.

1545

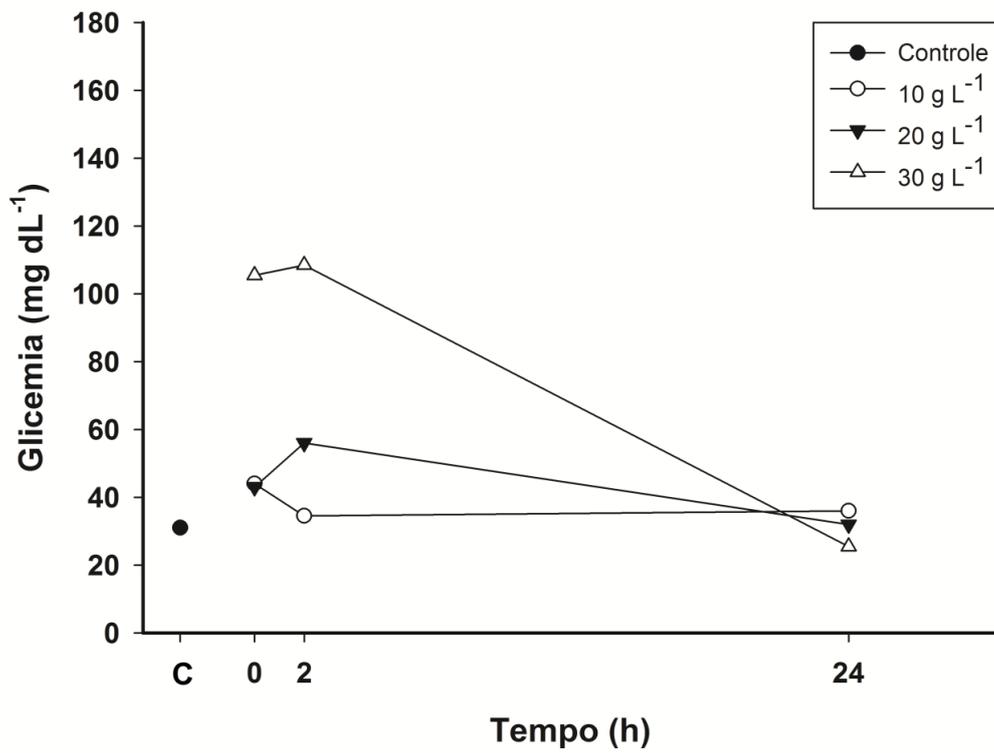
	Densidade (g L ⁻¹)	Tempo após o transporte (h)			
		Antes do Transporte	0	2	24
		Controle	0	2	24
Glicemia (mg dL ⁻¹)		30,1 ± 4,3 aA			
	10		44,7 ± 12,3 abB	35,1 ± 10,1 abAB	36,6 ± 7,2 bAB
	20		44,9 ± 11,1 abAB	67,8 ± 36,1 bcB	31,6 ± 5,6 abA
	30		102,9 ± 48,2 bB	115,5 ± 61,9 cB	25,3 ± 2,1 aA
Hematócrito (%)		31,2 ± 4,1 a			
	10		34,2 ± 8,8 a	35,5 ± 3,8 b	30,8 ± 8,0 a
	20		27,6 ± 5,8 a	27,8 ± 5,2 a	30,0 ± 4,2 a
	30		35,1 ± 9,7 a	31,4 ± 5,4 ab	27,6 ± 3,0 a
Osmolalidade (mmol kg ⁻¹)		338,3 ± 10,6 aA			
	10		355,4 ± 6,4 bB	339,9 ± 14,6 aA	359,2 ± 9,1 bB
	20		348,1 ± 2,9 bAB	338,8 ± 11,9 aA	355,6 ± 13,7 bB
	30		387,5 ± 28,3 bB	340,3 ± 8,5 aA	306,2 ± 10,8 cB

1546

1547 Para o hematócrito (Fig. 3), foi observado um aumento em sua porcentagem 2 h
 1548 após o retorno do transporte para 10 g L⁻¹, que foi significativamente diferente do
 1549 Controle e 20 g L⁻¹ ($P < 0,05$). Após 24 h de transporte não foi observado diferença entre
 1550 os tratamentos e o Controle ($P > 0,05$).

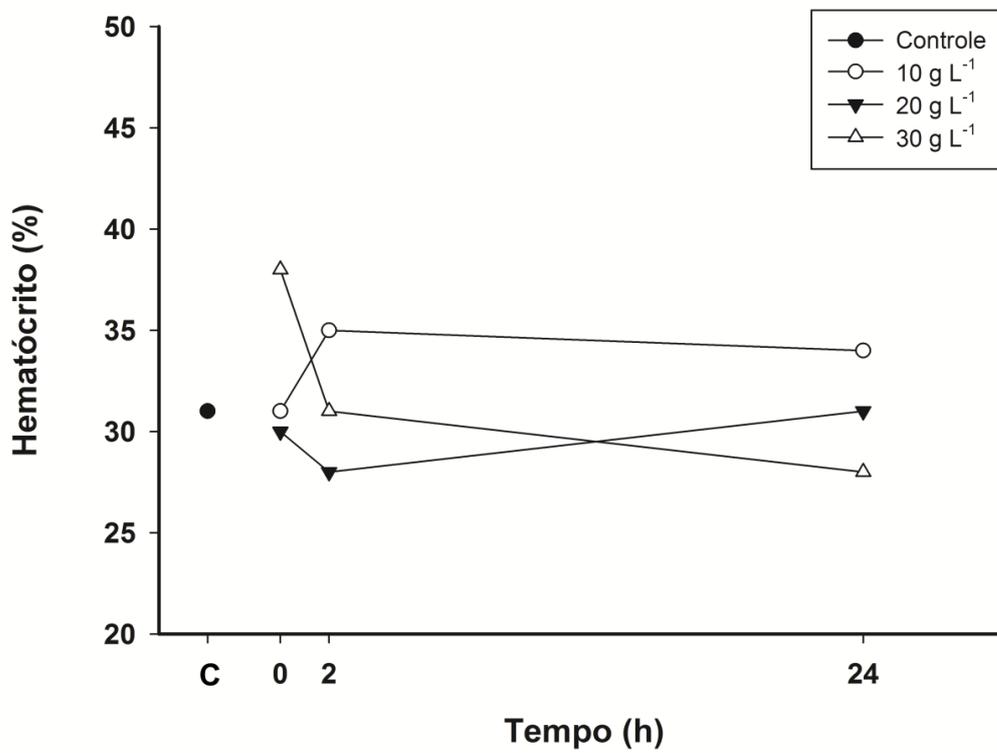
1551 Para osmolalidade (Fig. 4), logo após o transporte, foram observados valores
 1552 superiores ao Controle em todas as densidades ($P < 0,05$). Porém após duas horas, esses
 1553 valores já se apresentaram semelhantes ao do Controle ($P > 0,05$). Após 24 h, os peixes
 1554 nas densidades 10 e 20 g L⁻¹ apresentaram osmolalidade significativamente maior
 1555 ($P < 0,05$) que a observada no Controle, mas uma redução significativa foi observada
 1556 para os peixes que foram transportados na densidade 30 g L⁻¹ ($P < 0,05$).

1557



1558

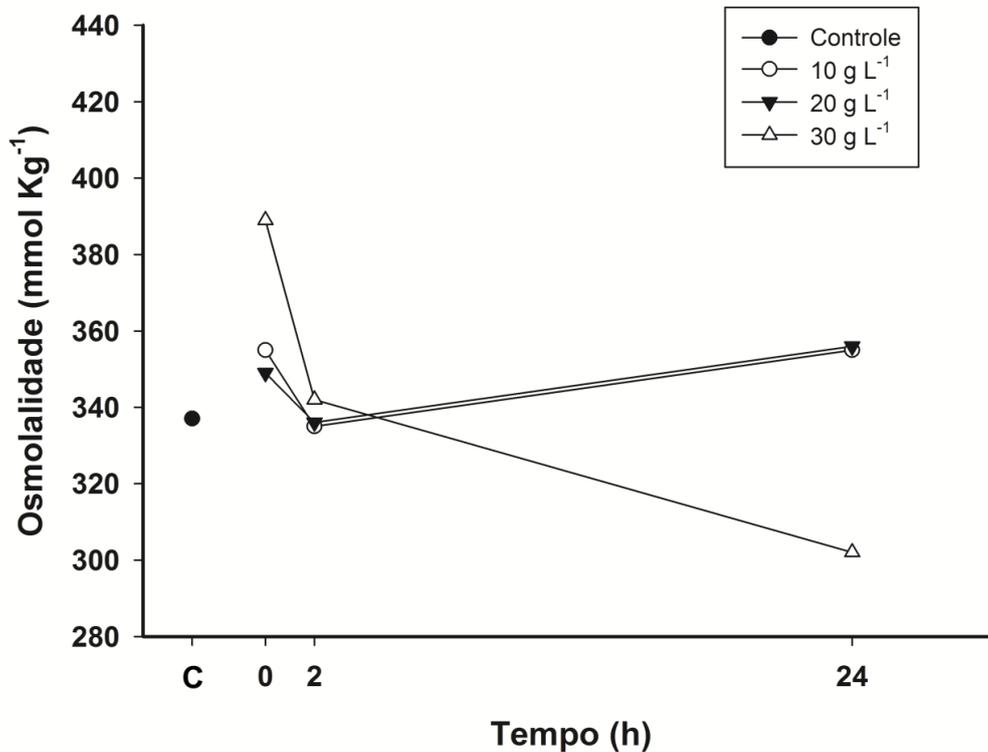
1559 Figura 2: Resposta de glicemia (mg dL⁻¹) de juvenis de *Rachycentron canadum* após 8 h
 1560 de transporte em diferentes densidades de estocagem.



1561

1562 Figura 3: Resposta do hematócrito (%) de juvenis de *Rachycentron canadum* após 8 h
1563 de transporte em diferentes densidades de estocagem.

1564



1565

1566 Figura 4: Resposta de osmolalidade (mmol kg⁻¹) de juvenis de *Rachycentron canadum*
1567 após 8 h de transporte em diferentes densidades de estocagem.

1568

1569 4. Discussão

1570

1571 4.1. Uso de benzocaína no transporte de bijupirá

1572

1573 Após exposição a agentes estressores, os peixes podem apresentar redução na
1574 taxa de crescimento, na capacidade reprodutiva e alteração comportamental (Wendelaar
1575 Bonga, 1997). Foi observado para algumas espécies de peixes que a utilização de
1576 anestésicos reduz a agitação e o estresse durante o transporte (Sandodden et al., 2001;
1577 Iversen et al., 2009; Park et al., 2009).

1578 Uma das principais respostas fisiológicas dos vertebrados após exposição à
1579 situação de estresse é o aumento nos níveis de cortisol e glicose no sangue, sendo sua
1580 quantificação considerada um dos métodos mais confiáveis para a quantificação do

1581 estresse sofrido (Barton, 1991; Ortuno 2001). No presente trabalho, peixes expostos à
1582 concentração de 6 mg L⁻¹ de benzocaína apresentaram valores elevados de glicemia até
1583 2h após o transporte, com pico de 150 mg dL⁻¹. Após 48h, a glicemia dos peixes
1584 transportados nas concentrações de 0 e 6 mg L⁻¹ já era semelhante aos níveis iniciais.
1585 Para adultos de matrinxã *Brycon cephalus* (1 kg) transportados com 5 mg L⁻¹ de
1586 benzocaína, foram observados valores de glicemia elevados imediatamente após o
1587 transporte, retornando a seus níveis iniciais após 24h (Carneiro et al., 2002). Em
1588 transporte realizado com 1 mg L⁻¹ do anestésico metomidato, juvenis de salmão do
1589 Atlântico *Salmo salar* apresentaram valores de glicemia elevados, mesmo após 48h
1590 (Sandodden et al., 2001).

1591 A liberação de catecolaminas promove a dilatação de eritrócitos e aumenta o
1592 número de células vermelhas circundantes, aumentando a concentração de hemoglobina
1593 no sangue (Wandelaar Bonga, 1997). No presente trabalho, os valores de hematócrito
1594 demonstraram leves variações, não diferindo entre os tratamentos. Para adultos de
1595 matrinxã *B. cephalus* também não ocorreu diferença nos valores de hematócrito de
1596 indivíduos transportados com 5, 10 e 20 mg L⁻¹ de benzocaína (Carneiro et al., 2002).

1597

1598 4.3. Efeito da densidade de estocagem no transporte de bijupirá

1599

1600 Para juvenis de bijupirá, logo após 8h de transporte, os níveis de glicemia foram
1601 elevados para indivíduos transportados na maior densidade (30 g L⁻¹), porém após 24h
1602 os níveis retornaram para valores próximos ao controle. Juvenis de tambaqui *Colossoma*
1603 *macropomum* (52 g) transportados por 10 h em densidades entre 78 e 312 g L⁻¹, também
1604 apresentaram valores de glicemia elevados após a chegada do transporte nas maiores
1605 densidades, retornando a valores similares aos níveis basais após 24 h (Gomes et al.,
1606 2003).

1607 A liberação de cortisol no sangue é uma resposta primária em peixes e tem como
1608 importância fisiológica a regulação do balanço hidromineral e metabolismo energético.
1609 Por isso, mudanças na osmolalidade são características de respostas secundárias ao
1610 estresse (Wendelaar Bonga, 1997). Peixes em meios hipertônicos tipicamente
1611 apresentam um aumento na osmolalidade quando expostos a um agente estressor
1612 (Davis, 2006), o que foi observado no presente trabalho com o término do transporte.
1613 Após 24h do retorno, foi observado um pequeno aumento da osmolalidade nas
1614 densidades 10 e 20 g L⁻¹ e uma redução dos valores de osmolalidade na maior

1615 densidade. As variações ocorridas após 24h, provavelmente se devem a não
1616 estabilização dos níveis de osmolalidade no tempo amostrado.

1617 A qualidade da água é um fator determinante na sobrevivência de peixes
1618 transportados em sistemas fechados, onde o processo de degradação é iniciado na
1619 primeira hora após a embalagem dos sacos (Paterson et al., 2003). Em transporte
1620 fechado, os baixos valores de pH favorecem a ionização da amônia, considerada a
1621 forma menos tóxica para peixes (Singh et al., 2004). O aumento da concentração de
1622 CO₂ na água pode resultar em hipercapnia, diminuindo a capacidade de transporte de
1623 oxigênio pela hemoglobina devido ao efeito de Bohr. O transporte de oxigênio aos
1624 tecidos é reduzido em ambientes onde os níveis de CO₂ são maiores que 40 mg L⁻¹
1625 (Wedemeyer, 1996). A mortalidade de 39,5% observada para o transporte na densidade
1626 de 30 g L⁻¹, provavelmente está relacionada aos altos valores de CO₂, alcançando 67 mg
1627 L⁻¹ para esta densidade.

1628

1629 **5. Conclusões**

1630

1631 De acordo com os resultados apresentados no trabalho, é recomendado que não
1632 seja utilizado o anestésico benzocaína para o transporte de juvenis de bijupirá. Também
1633 não é recomendável utilizar densidades de estocagem acima de 20 g L⁻¹.

1634

1635 **6. Referências Bibliográficas**

1636

1637 Amend, N.F., Croy, T.R., Goven, B.A., Johnson, K.A., Mccarthy, D.H., 1982.
1638 Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon
1639 dioxide, pH and bacterial growth. Transactions of the American Fisheries
1640 Society 111, 603-611.

1641 Ashley, P., 2006. Fish welfare: Current issues in aquaculture. Applied Animal
1642 Behaviour Science 104, 199-235.

1643 Azambuja, C.R., Mattiazzi, J., Riffel, A.P.K., Finamor, I.A., Garcia, L.D.O., Heldwein,
1644 C.G., Heinzmann, B.M., 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on
1645 oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to
1646 transport. Aquaculture 319, 156–161.

- 1647 Barton, B.A. & Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in
1648 aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.
1649 Annual Review of Fish Diseases 10, 3–26.
- 1650 Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., Martins, M.L., 2002. Transport with different
1651 benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters
1652 and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). Acta
1653 Scientiarum 24(2), 555–560.
- 1654 Chandroo, K.P., Cooke, S.J., Mckinley, R.S., Moccia, R.D., 2005. Use of
1655 electromyogram telemetry to assess the behavioural and energetic responses of
1656 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress.
1657 Aquaculture Research 36, 1226-1238.
- 1658 Cnaani, A., Mclean, E., 2009. Time-course response of cobia (*Rachycentron canadum*)
1659 to acute stress. Aquaculture 289, 140-142.
- 1660 Colburn, H.R., Walker, A.B., Berlinsky, D.L., Nardi, G., 2008. Factors affecting
1661 survival of cobia, *Rachycentron canadum*, during simulated transport. Journal
1662 of the World Aquaculture Society 39, 678-683.
- 1663 Cooke, S., Suski, C.D., Ostrand, K.G., Tufts, B.L., Wahl, D.H., 2004. Behavioral and
1664 physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for
1665 handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*).
1666 Aquaculture 239, 509-529.
- 1667 Davis, K.B., 2006. Management of physiological stress in finfish aquaculture. North
1668 American Journal of Aquaculture 68, 116–121.
- 1669 Gomes, L.C., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A. R. M., Chippari-Gomes, A.R., Lopes,
1670 N.P., Urbinati, E.C., 2003. Effect of fish density during transportation on stress
1671 and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. Journal of the
1672 World Aquaculture Society 34(1), 76-84.
- 1673 Holt, G.J., Faulk, C.K., Schwarz, M.H., 2007. A review of the larviculture of cobia
1674 *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. Aquaculture 268, 181-187.
- 1675 Iversen, M., Finstad, B., Nilssen, K. J., 1998. Recovery from loading and transport
1676 stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Aquaculture 168, 387-394.
- 1677 Iversen, M., Eliassen, R.A., Finstad, B., 2009. Potential benefit of clove oil sedation on
1678 animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to
1679 sea. Aquaculture Research 40, 233-241.

- 1680 Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2001. Effects of short-term crowding stress on
1681 the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish &*
1682 *Shellfish Immunology* 11, 187-97.
- 1683 Park, M.O., Im, S.Y., Seol, D.W., Park, I.S., 2009. Efficacy and physiological responses
1684 of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil.
1685 *Aquaculture* 287, 427-430.
- 1686 Paterson, B.D., Rimmer, M.A., Meikle, G. M., Semmens, G.L., 2003. Physiological
1687 responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration
1688 during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions
1689 and ammonia in the plasma. *Aquaculture* 218, 717–728.
- 1690 Ross, L.G., Blanco, J.S., Martínez-Palacios, C., Raccota, I.S., Cueva, M.T., 2007.
1691 Anesthesia, sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan)
1692 using benzocaine and hypothermia. *Aquaculture Research* 38, 909-917.
- 1693 Sandodden, R., Finstad, B., Iversen, M., 2001. Transport stress in Atlantic salmon
1694 (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. *Aquaculture Research* 32(2), 87–
1695 90.
- 1696 Shaffer, R.V., Nakamura, E.L., 1989. Synopsis of biological data on the cobia
1697 *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). *FAO Fisheries Synopsis*. 153
1698 (National Marine Fisheries Service/S 153), U.S. Department of Commerce,
1699 NOAA Technical Report, National Marine Fisheries Service 82. Washington,
1700 D.C.
- 1701 Schreck, C., Jonsson, L., Feist, G., Reno, P., 1995. Conditioning improves performance
1702 of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation
1703 stress. *Aquaculture* 135, 99-110.
- 1704 Singh, R.K., Vartak, V.R., Balange, A.K., Ghughuskar, M.M., 2004. Water quality
1705 management during transportation of fry of Indian major carps, *Catla catla*
1706 (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton).
1707 *Aquaculture*, 235, 297–302.
- 1708 Small, B.C., 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma
1709 cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil
1710 anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218, 177-185.
- 1711 Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*. Nova Iorque, W. H. Freeman and Company.
1712 887 pp.

1713 Sulikowski, J.A., Fairchild, N.R., Howell, W.H., 2006. The effects of transport density
1714 on cortisol levels in juvenile winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*,
1715 Journal of the World Aquaculture Society 37(1), 107–112.

1716 Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Parra, M.A.L., 2004. Loading and
1717 transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various
1718 densities. Aquaculture 229, 389-400.

1719 Webb Jr., K.A., Hitzfelder, G.M., Faulk, C.K., Holt, G.J., 2007. Growth of juvenile
1720 cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating
1721 aquaculture system. Aquaculture 264, 223-227.

1722 Wedemeyer, G. A., 1996. Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman and
1723 Hall, New York. 232 pp.

1724 Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews 77,
1725 591-625.

1726

1727 **Conclusões Gerais**

1728

1729 • A ocorrência de períodos de anestesia e de recuperação considerados ideais,
1730 a não alteração de parâmetros hematológicos e as menores alterações de
1731 estresse oxidativo indicam o anestésico benzocaína como eficiente para
1732 juvenis de bijupirá *R. canadum*, quando administrado à concentração de 50
1733 mg L⁻¹.

1734

1735 • Não é recomendado o uso do anestésico benzocaína para o transporte de
1736 juvenis de bijupirá, já que a glicemia foi elevada quando o anestésico foi
1737 adicionado ao transporte.

1738

1739 • Também não é recomendável utilizar densidades de estocagem acima de 20
1740 g L⁻¹, devido à verificação de mortalidade de até 40% na densidade de 30 g
1741 L⁻¹.

1742