

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

RESPOSTAS DO MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*) A ANESTÉSICOS E  
ESTRESSORES

LUÍS ANTÔNIO KIOSHI AOKI INOUE

SÃO CARLOS

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

RESPOSTAS DO MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*) A ANESTÉSICOS E  
ESTRESSORES

Luís Antônio Kioshi Aoki Inoue

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS-SP

-2005-

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

l58rm

Inoue, Luís Antônio Kioshi Aoki.

Respostas do matrinxã ( *Brycon cephalus*) a anestésicos e estressores / Luís Antônio Kioshi Aoki Inoue. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

135 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Aquicultura. 2. Manejo. 3. Estresse. 4. Matrinxã. I. Título.

CDD: 639.8 (20<sup>a</sup>)

---

Orientador  
Prof. Dr, Gilberto Moraes

Dedico a tese aos meus pais e irmãs

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes pela orientação com sabedoria, amizade e, sobretudo, espírito jovem durante esses bons anos do doutorado.

Ao Dr. Luis Afonso do Institute for Marine Biosciences do National Research Council of Canada (IMB/NRC) pela co-orientação do trabalho de tese. Agradeço também ao Dr. Luís Afonso e a sua família por me receber tão bem em Halifax (Nova Scotia, Canadá).

Ao Prof. Dr. George Iwama da Acadia University (Wolfville, NS, Canadá) pela ajuda na concretização das atividades realizadas no Canadá.

Aos meus amigos (diria até meus irmãos) do Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução (DGE-UFSCar) pela assistência durante a execução dos, pelo menos, 13 experimentos que fizeram parte dessa tese. São eles: Alexandre Eneas, Andressa Amaral, Antonio Donizetti, Araceli Hackbarth, Aruak Gomes, Cássia Saccon, Claucia Honorato, Cristina Correa, Glauber, Grazielle Fernanda, Gustavo Rojas, Fábio Pedrucci, Ive Avilez, José Fernando, Lícia Lundstedt, Lucas Cortella, Lúcia Aguiar, Luciana Almeida, Rodrigo Camilo, Thiago Hori e Vânia Vieira.

Aos meus amigos André Cruz, Caroline Garcia, Cheila Boijink, Daniele Matoso, Jorge “Jorjão”, Leila Sagres, Liano Centofante, Luis Piau, Marcelo Vicari, Pedro, Regiane Ribeiro, Rogério Sousa, Rosemeire Curilla, Tatiane Callegario e Wellington Peres, que, embora fossem de outros setores da Universidade, ajudaram de alguma forma no desenvolvimento do presente trabalho.

A Dona Maria Giovanini (dona da casa onde moro aqui em São Carlos) e ao seu neto Lucas Vilani por toda ajuda e tratamento como um membro da família durante esses anos do doutorado.

Ao Prof. Alceno Fariz Miguel da Academia Nautilus de Pirassununga-SP pela amizade e trabalho que foi realizado ao longo desses anos na natação. Certamente essa segunda atividade e a necessária disciplina de treinamento para a realização das atividades da natação competitiva contribuem em muito na qualidade de vida e no desenvolvimento das atividades profissionais.

Ao Pesquisador do Cepta/Ibama Dr. José Augusto Senhorini pelo apoio no início da caminhada para o doutorado. Com certeza os trabalhos que realizamos em conjunto anteriormente foram fundamentais para o início das atividades do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 141595/01-9) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes BEX 1154/03-6) pelo suporte financeiro.

Ao National Research Council of Canada (NRC/CNRC) pelo suporte nos ensaios de laboratório realizado no Institute for Marine Biosciences (IMB) na cidade de Halifax, Nova Scotia, Canadá.

**RESUMO** – A piscicultura é uma das atividades agropecuárias que mais cresceu no Brasil recentemente, sendo a produção nacional de aproximadamente 120 mil toneladas por ano. Assim grande quantidade de peixes vivos é rotineiramente manuseada nas fazendas brasileiras, onde é também muito comum o relato de prejuízos por mortalidade de peixes manuseados de forma inadequada. O matrinxã (*Brycon cephalus*) é uma das espécies nativas, que mais tem chamado a atenção nesse sentido, ressaltando as diferentes práticas de manejo como relevantes fontes de estresse. O presente trabalho visou avaliar os principais estressores presentes nas unidades de piscicultura (manuseio, transporte e mudanças de temperatura), associando-se tentativas de redução desse estresse através do uso de anestésicos como o eugenol, a benzocaina e o fenoxietanol. Nossos resultados indicam que o matrinxã é uma espécie bastante responsiva a esses estressores, evidenciando as principais respostas fisiológicas ao estresse, elucidados através das alterações das concentrações plasmáticas de cortisol, glicose, lactato, amônia, proteína e íons (Na, Cl, K). O custo energético alto para o matrinxã tolerar as práticas de manejo foi também evidenciado através das reduções observadas dos valores de glicogênio hepático. O matrinxã não evidenciou o estresse celular ao manuseio e choques térmicos como se esperava aumentos na expressão da proteína de estresse (hsp-70) em seus tecidos frente a esses estressores. Aumentos nas expressões de outras proteínas de estresse parecem ainda estar relacionada ao estresse celular do matrinxã, indicando a necessidade de novos estudos nessa espécie.

**Palavras-chave:** matrinxã, estresse, anestésicos, manuseio, transporte, temperatura.



PHYSIOLOGICAL STRESS RESPONSES OF MATRINXÃ (*BRYCON  
CEPHALUS*) TO ANESTHETICS AND FISH FARM STRESSORS

**ABSTRACT** – Commercial fish farming has been viable for industry in Brazil. National production is around 120 thousand tons/year. In this way, large amount of fishes are handled every day in our farms. However, drastic consequences are sometimes observed due to the high sensitivity of some tropical fish to handling procedures. Matrinxã (*Brycon cephalus*) is a native species that is very sensitive to handling, in which mortality is usually observed. So stress studies in tropical fish in aquaculture facilities are important as farmers need more information about these fish stress and alternatives for fish management. The present work evaluated some matrinxã stress responses, and the use of anesthetics as eugenol, benzocaine and 2-phenoxyethanol to reduce the stress during field procedures. Matrinxã is responsive to fish farm stressors as handling, transport and thermal shocks. Increases of plasma cortisol, glucose, lactate and ammonia indicated acute primary and secondary stress responses of matrinxã. Plasma ions (Na, Cl and K) and protein unbalance were observed. Liver glycogen indicated the high energetic cost to matrinxã cope with the studied stressors. Stress responses at the cellular level were not detected in matrinxã as hsp-70 expressions were not altered. Other proteins expressions may be related to matrinxã celular stress, which requires new studies in the future.

**Key words:** matrinxã, stress, anesthetics, handling, transport, temperature.



## Lista de Figuras

## REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1.	Esquema dos conjuntos das respostas fisiológicas e bioquímicas ao estresse.....	12
-----------	---	----

## CAPÍTULO 2

Figura 1.	Tempo (s) de indução ao estágio 3 de anestesia (perda total de equilíbrio e inabilidade de retorno a posição normal de nado) por eugenol em juvenis de matrinxã.....	42
-----------	--	----

Figura 2.	Tempo (s) de indução ao estágio 3 de anestesia (perda total de equilíbrio e inabilidade de retorno a posição normal de nado) por benzocaina em juvenis de matrinxã.....	43
-----------	---	----

Figura 3.	Arranjo matemático do efeito anestésico do fenoxietanol em juvenis de matrinxã.....	44
-----------	---	----

## CAPÍTULO 3

Figura 1.	Valores de frequência respiratória ( $F_R$ – breaths/min) do matrinxã durante protocolo experimental de anestesia (barras em cinza) e posterior recuperação ao eugenol, benzocaina e fenoxietanol.....	62
-----------	--	----

Figura 2.	Valores de amplitude de ventilação ( $V_{amp}$ %) no matrinxã durante protocolo experimental de anestesia (barras em cinza) e posterior recuperação ao eugenol, benzocaina e fenoxietanol.....	63
-----------	--	----

Figura 3.	Valores de ventilação total ( $V_{tot}$ - %) do matrinxã durante protocolo experimental de anestesia (barras em cinza) e posterior recuperação ao eugenol, benzocaina e fenoxietanol.....	64
-----------	---	----

Figura 4.	Valores de frequência cardíaca ( $f_H$ – beats/min) do matrinxã durante protocolo experimental de anestesia (barras em cinza) e posterior recuperação ao eugenol, benzocaina e fenoxietanol.....	65
-----------	--	----

Figura 5.	Valores de pressão arterial ( $P_a$ - %) do matrinxã durante protocolo experimental de anestesia (barras em cinza) e posterior recuperação ao eugenol, benzocaina e fenoxietanol.....	66
-----------	---	----

## CAPÍTULO 4

Figura 1.	Valores de hematócrito (%) do matrinxã, quando submetido ao manejo e banhos anestésicos com eugenol, benzocaina e fenoxietanol.....	80
-----------	---	----

Figura 2.	Valores plasmáticos (média $\pm$ s.e.) de glicose, lactato e amônia no matrinxã submetido ao manejo de anestesia com eugenol, benzocaina e fenoxietanol.....	81
-----------	--	----

## CAPÍTULO 5

Figura 1.	Efeito do óleo de cravo no cortisol plasmático do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos.....	102
Figura 2.	Cortisol plasmático (a), Glicogênio hepático (b) e glicose plasmática (c) ao longo do Experimento III.....	103
Figura 3.	Amônia plasmática de juvenis de matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ) submetidos ao transporte em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo na concentração de 5 mg/L.....	104
Figura 4.	Amônia plasmática ao longo do Experimento III. Juvenis de matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ) foram transportados por 4 h em sacos plásticos supridos ou não de sal marinho.....	105
Figura 5.	Glicogênio hepático de juvenis de matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ) submetidos ao transporte em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo na concentração de 5 mg/L.....	106
Figura 6.	Valores de sódio, cloreto e potássio plasmáticos em juvenis de matrinxã submetidos ao transporte em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo na concentração de 5 mg/L.....	107

## CAPÍTULO 6

Figura 1.	Efeito do choque térmico frio de 1 h (de 28°C para 18 °C) nos valores de cortisol do matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ).....	123
Figura 2.	Efeito do choque térmico frio de 1 h (de 28°C para 18 °C) nos valores de glicose plasmática do matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ).....	124
Figura 3.	Intensidade de bandas da proteína de estresse (HSP 70) em branquias de matrinxã submetido ao choque térmico de 28°C para 18°C.....	125

## Lista de Tabelas

CAPÍTULO 2		
Tabela 1	Características comportamentais dos peixes de acordo com os diferentes estágios de anestesia.....	41
CAPÍTULO 3		
Tabela 1	Características comportamentais dos peixes de acordo com os diferentes estágios de anestesia.....	61
CAPÍTULO 4		
Tabela 1	Valores plasmáticos de sódio, cloreto, potássio e proteína do matrinxã exposto ao eugenol, benzocaina e fenoxietanol .....	79
Tabela 2	Características comportamentais dos peixes de acordo com os diferentes estágios de anestesia.....	79
CAPÍTULO 5		
Tabela 1	Qualidade da água de transporte de juvenis de matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ) em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo.....	99
Tabela 2	Qualidade da água ao longo do Experimento III.....	100
Tabela 3	Efeito do óleo de cravo no cortisol plasmático (ng/ml) do matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ) submetido ao transporte em sacos plásticos.....	100
Tabela 4	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> e proteína no plasma do matrinxã ao longo do Experimento III.....	101

## Sumário

REVISÃO DA LITERATURA.....	1
.....	
1. Introdução.....	1
.....	
2. Piscicultura: universo do estudo.....	2
3. Fontes de estresse em piscicultura.....	4
4. Respostas primárias, secundárias e terciárias do estresse.....	5
5. Respostas ao estresse celular.....	8
6. O matrinxã.....	10
.....	
7. Referências bibliográficas.....	13
.....	
OBJETIVO DO PRESENTE ESTUDO.....	18
ABORDAGENS ESPECÍFICAS.....	18
.....	
CAPÍTULO 1 - Ferramentas para estudo do estresse em matrinxã.....	19
Resumo.....	19
.....	
Abstract.....	19
.....	
1. Introdução.....	20
.....	
2. Instalações e coleta de material biológico.....	21
3. Parâmetros hematológicos.....	22
....	
Hematócrito.....	22
.....	
Hemoglobina.....	22
.....	
Contagem de células vermelhas do sangue (RBC).....	22
Volume corpuscular médio	23

(VCM).....	23
Hemoglobina corpuscular média (HCM).....	23
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).....	23
4. Parâmetros plasmáticos.....	23
.....	
Cortisol.....	23
.....	
Glicose.....	24
.....	
Açúcares totais.....	24
.....	
Lactato.....	24
.....	
Amônia.....	25
.....	
Íons.....	25
.....	
Proteína total.....	26
.....	
5. Parâmetros tissulares.....	26
.....	
Glicogênio hepático.....	26
.....	
Proteína de choque térmico (HSP- 70).....	27
6. Preparação e envio do material biológico para o Canadá.....	29
7.....	29
Considerações.....	
.....	
8. Referências bibliográficas.....	30
.....	
CAPÍTULO 2 - Avaliação da eficiência anestésica do eugenol, benzocaina e fenoxietanol para o manuseio de juvenis de matrinxã <i>Brycon cephalus</i> (Gunther, 1869): tempo de indução.....	32
Resumo.....	32
.....	
Abstract.....	32
.....	
1.....	33

Introdução.....	
.....	
2. Material e métodos.....	35
.....	
3. Resultados.....	37
.....	
4. Discussão.....	38
.....	
5. Referências bibliográficas.....	45
.....	
CAPÍTULO 3 – Avaliação da eficiência anestésica do eugenol, benzocaina e fenoxietanol para o manuseio de juvenis de matrinxã <i>Brycon cephalus</i> (Gunther, 1869): Respostas cardiorrespiratórias.....	48
Resumo.....	48
.....	
Abstract.....	49
.....	
1. Introdução.....	49
.....	
2. Material e métodos.....	51
.....	
3. Resultados.....	54
.....	
4. Discussão.....	55
.....	
5. Conclusão.....	60
.....	
6. Referências bibliográficas.....	67
.....	
CAPÍTULO 4 - Avaliação da eficiência anestésica do eugenol, benzocaina e fenoxietanol para o manuseio de juvenis de matrinxã <i>Brycon cephalus</i> (Gunther, 1869): respostas hematológicas e plasmáticas.....	70
.....	
Resumo.....	70
.....	
Abstract.....	71
.....	

1.	71
Introdução.....	
2. Material e métodos.....	73
3.	75
Resultados.....	
4.	75
Discussão.....	
5. Referências bibliográficas.....	82
.....	
CAPÍTULO 5 - Respostas fisiológicas e bioquímicas do matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> ) submetido ao transporte.....	85
Resumo.....	85
Abstract.....	86
1.	86
Introdução.....	
2. Material e métodos.....	88
3.	90
Resultados.....	
4.	93
Discussão.....	
5. Referências bibliográficas.....	10
.....	
CAPÍTULO 6 – Respostas fisiológicas ao estresse do matrinxã <i>Brycon cephalus</i> (Gunther, 1869) submetido a um choque frio abrupto	11
Resumo.....	11
Abstract.....	11
1.	11
Introdução.....	3
2. Material e métodos.....	11
	5

.....	
3.	11
Resultados.....	7
.....	
4.	11
Discussão.....	7
.....	
5.	12
Conclusão.....	2
.....	
6. Referências	12
bibliográficas.....	6
.....	
Considerações	13
finais.....	0
.....	
Anexos.....	13
.....	4

# REVISÃO DA LITERATURA

## Respostas do matrinxã (*Brycon cephalus*) a anestésicos e estressores

### 1. Introdução

A piscicultura é uma das atividades agropecuárias que mais cresceu recentemente no Brasil. Graças aos recentes avanços tecnológicos na produção de alevinos das espécies nativas e à viabilização da comercialização de peixes através dos pesque-pagues, supermercados, feiras e frigoríficos, a quantidade de peixes vivos, manejada rotineiramente no país, é bastante grande, chegando à ordem de 120 mil toneladas ao ano (Scorvo-Filho, 2002). No entanto, é bastante comum o relato de prejuízos econômicos expressivos devido à mortalidade decorrente das deficiências gerais de manejo, tais como, a alimentação inadequada, a baixa qualidade da água e a insuficiente sanidade dos animais. Ainda, perdas por manipulações de peixes realizadas de maneira inadequada (grosseira) são também observadas (Kubitza, 1998).

A piscicultura, além de movimentar um setor de importância crescente na produção de alimentos, gera também empregos e renda em outros segmentos do “Agribusiness” como as indústrias de rações, medicamentos e equipamentos.

Dentre as espécies nativas, o matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) é uma das que mais vem sofrendo com o desconhecimento de técnicas apropriadas para o seu cultivo, pois é um peixe bastante sensível. Como exemplo, um simples arrasto de redes e manipulação de matrinxãs realizada de maneira grosseira pode acarretar em excessivas perdas de muco e escamas,

podendo assim, em muitos casos, provocar elevadas taxas de mortalidade (Kubitza, 1998).

O presente trabalho foi elaborado para se entender como o matrinxã responde a diversos estímulos adversos a homeostase, os quais os peixes estão comumente expostos nas estações de piscicultura. Os animais foram submetidos aos estressores: manuseio, transporte e choque térmico. A partir daí caracterizou-se uma série de respostas fisiológicas, numa investigação das principais alterações endócrinas, hematológicas, metabólicas e celulares do matrinxã, que, além de contribuir para o conhecimento básico da biologia dessa espécie, auxiliou-nos a esclarecer alguns procedimentos ou até mesmo propor alternativas no manejo.

## **2. Piscicultura: universo do estudo**

A piscicultura é a atividade agropecuária que visa a produção racional de peixes, exercendo-se especial controle sobre a alimentação, reprodução e crescimento dos animais. As estações de piscicultura têm por objetivo geral a produção de alimentos para a subsistência do produtor rural e/ou a geração de renda. A piscicultura é ainda praticada para atender programas de repovoamento de rios, represas de usinas hidro-elétricas, açudes e ornamentação (Castagnolli, 1992).

As instalações e o manejo de peixes variam muito entre as unidades de produção, porém todas procuram respeitar princípios básicos da aqüicultura, tais como o monitoramento constante da qualidade da água, da alimentação e da sanidade dos animais.

Muitos autores classificam os sistemas de produção de peixes de acordo com o grau de interferência do homem (Castagnolli, 1992). Dessa forma, o mais elementar sistema de cultivo é o extensivo, caracterizado pela baixíssima manipulação do sistema e confundido, muitas vezes, com o extrativismo e o baixo manejo da pesca de pequena escala (Proença & Bittencourt, 1994). Assim, a piscicultura extensiva emprega poucos recursos, caracterizando-se por simples povoamento de pequenos corpos de água, onde a alimentação dos peixes é geralmente constituída de subprodutos diversos e muitas vezes de forma irregular, sendo os índices zootécnicos de produtividade extremamente baixos (100-400 kg/ha/ano).

O segundo e mais praticado sistema de cultivo no Brasil é o sistema semi-intensivo (Castagnolli, 1992), em que já ocorre um maior grau de interferência do homem. Esse sistema é descrito pelo uso de tanques e viveiros, que possam ser manejados, quanto ao abastecimento e drenagem de água, empregando-se também a correção de alguns parâmetros da qualidade da água como o pH, a alcalinidade e a dureza, através da calagem. A alimentação dos peixes é realizada de maneira regular por meio do emprego racional de produtos e subprodutos da propriedade rural como restos de cultura de milho, arroz, aves, suínos, etc. É adotado também, mas não obrigatoriamente, o fornecimento de rações artificiais e completas. Neste sistema leva-se ainda em consideração a produtividade natural dos viveiros de fitoplâncton e zooplâncton, que são estimulados pelo emprego da adubação mineral e orgânica. Utiliza-se ainda no sistema semi-intensivo os policultivos (várias espécies de peixes no mesmo viveiro) e os cultivos consorciados com outros animais, que otimizam o uso do ecossistema aquático. Os índices

zootécnicos de produtividade do sistema semi-intensivo são bem mais altos que no sistema extensivo, podendo-se atingir 8 ton/ha/ano (Scorvo-Filho, 2002).

A interferência humana em graus extremos está presente nos sistemas intensivos e superintensivos de cultivo, que são caracterizados pelo absoluto controle das instalações, da qualidade da água e da alimentação. As fazendas de produção intensiva e superintensiva de peixes procuram fazer o máximo uso da água e da terra (Suresh & Lin, 1996) com pequenos tanques e gaiolas até grandes viveiros de 4-5 ha de lâmina d'água (Boyd, 1982). Nestes sistemas de cultivo ocorre o emprego de mão-de-obra capacitada, operando também laboratórios e equipamentos sofisticados. A alimentação dos animais é obrigatoriamente artificial e completa e não se leva em consideração a alimentação natural que possa ocasionalmente ocorrer. As densidades e os índices zootécnicos são bastantes elevados, podendo-se chegar a mais de 250 kg/m<sup>3</sup>/ano (Schmittou, 1997). A escala de produção das piscigranjas é na maioria dos casos industrial e visa atender aos diversos segmentos do mercado, tais como frigoríficos, supermercados, peixarias e pesque-pagues.

### **3. Fontes de estresse em piscicultura**

Muitos trabalhos estão sendo realizados em diversas áreas do conhecimento relacionado à piscicultura (sanidade, manejo, nutrição, qualidade química e física da água etc), sendo que todos buscam o aprimoramento da produção de peixes, atividade bastante dinâmica que requer dia-a-dia o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo (Iwama *et al.*, 1997). Dessa forma, o manuseio de peixes vivos tem sido assunto bastante relevante nas pesquisas

em piscicultura, pois a inevitável manipulação dos organismos causa uma série de reações fisiológicas adversas. Os organismos submetidos ao manuseio sofrem alterações de suas condições metabólicas iniciais, que constituem os desvios da homeostase (Iwama *et al.*, 1997). Assim, um dado conjunto de respostas fisiológicas pode ser considerado como resultante de estresse (Iwama *et al.*, 1997). A intensidade das alterações e o tempo para atingir o completo retorno às condições fisiológicas iniciais são indicadores bastante úteis da qualidade da manipulação dos peixes. Dessa forma, a partir do momento em que os peixes estejam devidamente recuperados, eles estarão novamente no ciclo de produção, alimentando-se, crescendo e até reproduzindo-se normalmente.

As fontes de estresse mais comuns nas unidades de piscicultura são o manuseio e o transporte. A captura dos peixes com redes de arrasto, puçás ou demais artefatos e o manuseio como anestesia, biometria, marcação e troca de caixa são estressores agudos como o transporte, que é uma etapa posterior a partir da qual os peixes são acondicionados em sacos plásticos e posteriormente lacrados em atmosfera modificada com oxigênio puro. Os peixes podem ser também acondicionados em tambores ou caixas (de 300 a 2000 L) equipadas com “borbulhadores” de oxigênio. Esses recipientes são próprios para o transporte de peixes, permitindo densidades altíssimas, que chegam a até 500 kg/m<sup>3</sup> (Kubitza, 1998). Essas caixas de transporte de peixes são ainda transportadas por diferentes veículos em distâncias variadas desde poucos metros até milhares de quilômetros, quando os peixes são liberados em condições similares às iniciais anteriores a imposição dos estressores.

Outra fonte de estresse que também se observa nas estações de piscicultura é o choque térmico por ocasião da transferência dos peixes para lugares distintos aos de origem, principalmente no que tange à temperatura da água. As chuvas repentinas e intensas, frequentemente observadas no verão brasileiro (Esteves, 1988), são também importante causa de choque térmico para os peixes, pois a água da chuva que cai sobre os corpos de água, normalmente é mais fria que a água dos tanques e viveiros, podendo provocar um resfriamento bastante rápido. O choque térmico é um importante agente estressor para os peixes tropicais, pois a mudança brusca e repentina da temperatura ambiental pode causar extremos e imediatos desbalanços nas reações enzimáticas desses animais heterotermos (Tanck *et al.*, 2000).

#### **4. Respostas primárias, secundárias e terciárias ao estresse**

O conjunto de respostas fisiológicas expressa pelos peixes devido a estímulos adversos a homeostase (Figura 1) são usualmente conhecidas como as respostas primárias, secundárias e terciárias ao estresse (Mazeaud *et al.*, 1977). As respostas primárias referem-se ao reconhecimento do estressor pelo organismo através do sistema nervoso central, onde são observadas as reações hormonais do eixo Hipotálamo-Pituitária-Interrenais (HPI). Logo que o indivíduo percebe os estímulos externos adversos a homeostasia, ocorre a liberação na corrente sangüínea das catecolaminas, pelas células de cromafina, e do cortisol pelas células interrenais, localizadas na região anterior dos rins (Mommsen *et al.*, 1999).

As reações dos peixes em resposta a mudanças no ecossistema são desencadeadas de forma que o indivíduo sempre busque o retorno da

homeostase através da fuga ou caso essa não seja possível, por meio de ajustes e adaptações fisiológicas que consomem demanda extra de energia, cujas fontes são diversas. O desencadeamento das respostas secundárias ao estresse por ação do aumento do cortisol plasmático é caracterizado pelo desbalanço em vias bioquímicas responsáveis pelo equilíbrio no fornecimento de energia para o organismo, em todos os momentos de sua vida (Mazeaud *et al.*, 1977).

A influência do cortisol e as alterações na gliconeogênese e na glicogenólise são algumas das respostas ao estresse mais estudadas em peixes (Pickering *et al.*, 1981; Pickering 1981), pois seguido ao aumento do cortisol plasmático, observa-se o aumento dos teores de glicose plasmática (Hattingh, 1976), que pode ser originária de diversos mecanismos do metabolismo (Mommsen *et al.*, 1999), tais como, a quebra das reservas de glicogênio hepático e o aumento das atividades do metabolismo de proteínas. Sinais da ação do aumento do cortisol plasmático na gliconeogênese são também descritos por mudanças nas taxas de transaminação, que usualmente são detectadas pelas alterações das concentrações de amônia e proteína plasmática (Mommsen *et al.*, 1999).

O aumento de catecolaminas e do cortisol plasmático resultam em aumento dos parâmetros cardíacos (batimentos e pressão arterial) e respiratórios (frequência respiratória e ventilação) em peixes (Iwama *et al.*, 1997; Barreto & Volpato, 2004). Logo, o aumento da circulação nos peixes, associado ao aumento dos batimentos operculares resulta em claras mudanças da capacidade de trocas através de difusões nas brânquias (Mommsen *et al.*, 1999). Forte desbalanço eletrolítico é evidenciado por teores plasmáticos

alterados de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ . Significativo desbalanço da excreção nitrogenada dos peixes é também evidenciado pelo aumento da amônia plasmática (McDonald & Milligan, 1997).

Situações de estresse em peixes podem causar ainda uma demanda energética maior que a sustentável pelo metabolismo aeróbico. Alguns estressores podem dificultar o suprimento de oxigênio às células, tanto por meios diretos, como estressores que reduzem a concentração de oxigênio ambiental (exemplo: “over turn” do oxigênio dissolvido na coluna de água), quanto por meios indiretos, como a diminuição da capacidade respiratória induzida por determinado agente estressor (exemplo: a presença de parasitas nas brânquias, ou danos nas lamelas brânquiais por compostos xenobioticos). Assim, o metabolismo anaeróbico é evidenciado através do clássico aumento do teor de lactato plasmático, que pode ser um bom indicador da intensidade de muitos estressores (Hochachka, 1980).

As respostas terciárias aos agentes estressores são conhecidas por evidenciar a incapacidade dos indivíduos em se adaptar ou retornar a homeostase, indicando que um estímulo adverso teve intensidade e/ou duração excessiva ou crônica (Mazeaud *et al.*, 1977). Nesse estágio de estresse são observadas as reais perdas na produção de peixes. As respostas terciárias evidenciam as respostas fisiológicas dos indivíduos ou da população de forma geral, sendo notada a queda nas taxas de crescimento, na resistência a doenças e na capacidade de natação (Iwama *et al.*, 2004).

## **5. Respostas celulares ao estresse**

Atualmente, as pesquisas mais avançadas em estresse de peixes estão levando também em consideração as alterações citoplasmáticas, quando o organismo é submetido a diversos estressores (Iwama *et al.*, 2004). Os estudos na determinação do estresse celular ocorrem predominantemente através das técnicas laboratoriais de detecção das proteínas de estresse (Heat Shock Proteins - hsp): hsp 30, hsp 70 e hsp 90, onde o número indica o peso molecular aparente, determinado em gel de poliacrilamida-SDS.

As hsp foram inicialmente estudadas em insetos submetidos a elevações abruptas de temperatura (donde vem o nome desse grupo de proteínas), sendo suas expressões bastante incrementadas por efeito térmico (Nunamaker *et al.*, 1996; Burton *et al.*, 1988; Joplin *et al.*, 1990). Imediatamente, muitos outros estudos começaram a avaliar o aumento das hsp em outros organismos para a detecção das respostas a diferentes estressores em nível celular.

As respostas celulares ao estresse observada em peixes fazem parte do conjunto das respostas primárias, podendo estar relacionadas às demais respostas fisiológicas dos organismos, que tendem a buscar a manutenção da homeostase (Iwama *et al.*, 1997). A exposição dos peixes a fatores estressantes resulta em aumento na síntese dessas proteínas, que servem para proteger os organismos contra estímulos subseqüentes (Ackerman *et al.*, 2000). As hsp existem nas células em níveis constitutivos, que são requisitados em muitos aspectos do metabolismo protéico, a fim de se manter a homeostase celular (Iwama *et al.*, 2004). As proteínas de estresse (hsp) são as chaperoninas moleculares, cujos papéis, em conjunto com os ribossomos no citoplasma, são de auxiliar o dobramento inicial de proteínas em formação, bem como auxiliar no reparo de proteínas citoplasmáticas, que sofreram

alterações diversas e/ou desnaturação. As hsp atuam também na agregação, desdobramento e redobramento de proteínas do citoplasma.

Muitos estudos descrevem o estresse em peixes através das elevações do cortisol e glicose plasmática em resposta a imposição de diversos estímulos adversos a homeostase. Atualmente, esses buscam a relação entre o estresse fisiológico dos peixes e as condições de suas células. Esse enfoque foi primeiramente relatado através do aumento das concentrações plasmáticas de cortisol e glicose, associadas às elevações nos níveis constitutivos das hsp em peixes de água fria submetidos a aumentos repentinos de temperatura da água (Ackerman *et al.*, 2000; Zarate & Bradley, 2003; Iwama *et al.*, 2004).

Estudos subseqüentes procuraram estabelecer as relações entre os aumentos do cortisol e da glicose plasmática e as expressões das hsp, quando os peixes eram submetidos a patógenos e compostos químicos. As respostas detectadas foram bastante evidentes, mostrando elevações significativas nos níveis das hsp e do cortisol e glicose do plasma (Vijayan *et al.*, 1998; Ackerman & Iwama, 2001; Iwama *et al.*, 2004). Assim, a curiosidade sobre a aplicabilidade de tal ferramenta no estudo do estresse celular em peixes ficou ainda mais motivada.

Estímulos adversos a homeostase em peixes, presentes no dia a dia de muitas unidades de piscicultura, não têm evidenciado respostas *in vivo* do estresse celular em estudos com o salmão (*Salmo salar*). São eles: anestesia, banhos em formol, sub e super saturação de oxigênio dissolvido na água, “handling” (manuseio agudo e rápido), restrição alimentar, adensamento populacional e choque frio (Zarate & Bradley, 2003). Entretanto, a exposição de peixes a muitos desses estressores certamente induz o estresse celular, do

qual o estudo das hsp isoladamente não é capaz de responder à complexidade do estado fisiológico dos peixes e às condições de suas células. Logo, o estudo dos proteomas, conjunto das proteínas expressas por determinado genoma (Pimenta, 2003), em associação com as tecnologias da bioinformática serão os artifícios futuros nas pesquisas das relações do estresse fisiológico e celular em peixes (Iwama *et al.*, 2004).

## **6. O matrinxã**

O matrinxã é um peixe originário da bacia amazônica, que vem sendo cultivado em todo o país com excelentes índices de crescimento e eficiência alimentar (Saint-Paul, 1986). É muito apreciado no mercado consumidor, inclusive nos estabelecimentos de pesca esportiva, pois apresenta comportamento agressivo no ataque às iscas, além de notável habilidade de natação (Carneiro & Urbinati, 2001).

As primeiras tentativas de produção em larga escala do matrinxã foram frustradas no passado devido à baixa taxa de sobrevivência de larvas nas incubadoras. Nessa fase de vida, as larvas apresentam canibalismo extremo, principalmente entre 12 e 72 h de idade. Pesquisadores da época trabalharam intensamente, solucionando tal entrave através do fornecimento racional de larvas de outras espécies de peixes (*Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus scrofa* e *Cyprinus carpio*) às larvas de matrinxã (Ceccarelli & Senhorini, 1996, Gomes *et al.*, 1999). Entretanto, diversos são ainda os aspectos que vêm sendo estudados no cultivo em larga escala dessa espécie, especialmente os parâmetros de nutrição, reprodução e sistemas de criação (Mendonça, 1994).

O matrinxã é um peixe onívoro, que aproveita satisfatoriamente muitos alimentos (Goulding, 1980), apresentando assim índices zootécnicos favoráveis frente ao fornecimento de alimentos de origem animal e vegetal (Cyrino *et al.*, 1986; Mendonça *et al.*, 1993). Mesmo sendo bastante exigente quanto à qualidade da água para o seu crescimento adequado, o matrinxã é uma espécie com relativa tolerância a baixos teores de oxigênio na água. De forma semelhante a outras espécies de peixes amazônicos, o matrinxã mostra expansão do lábio inferior quando submetido a hipóxia, propiciando que o peixe capte água mais rica em oxigênio ao nadar nas camadas superficiais da coluna de água (Baldisserotto, 2002).

O matrinxã é um peixe que se apresenta bastante sensível às práticas de manejo do dia-a-dia da piscicultura por ter um comportamento notavelmente agitado, realizando movimentos extremamente vigorosos, quando o seu espaço é reduzido nas redes de arrasto e caixas de manejo. Por ação dessa movimentação excessiva, observa-se grande perda de muco e escamas, facilitando doenças que trazem prejuízos às fazendas (Inoue *et al.*, 2003).

Técnicos da área têm realizado diversas tentativas para amenizar as inevitáveis conseqüências durante o manuseio do matrinxã através do uso de produtos condicionadores como o sal marinho (Carneiro & Urbinati, 2001a) e anestésicos, como a benzocaína (Carneiro & Urbinati, 2001b, Urbinati & Carneiro, 2001, Inoue *et al.*, 2002), o fenoxietanol (Inoue *et al.*, 2004), a tricaína metano-sulphonate MS222 (Roubach *et al.*, 2001) e o eugenol (Inoue *et al.*, 2003). Porém, os benefícios reais no uso de produtos condicionadores e anestésicos têm sido controversos, pois nem sempre são relatadas vantagens

diretas, cientificamente comprovadas no âmbito da biologia e fisiologia de peixes (Kubitza, 1998).

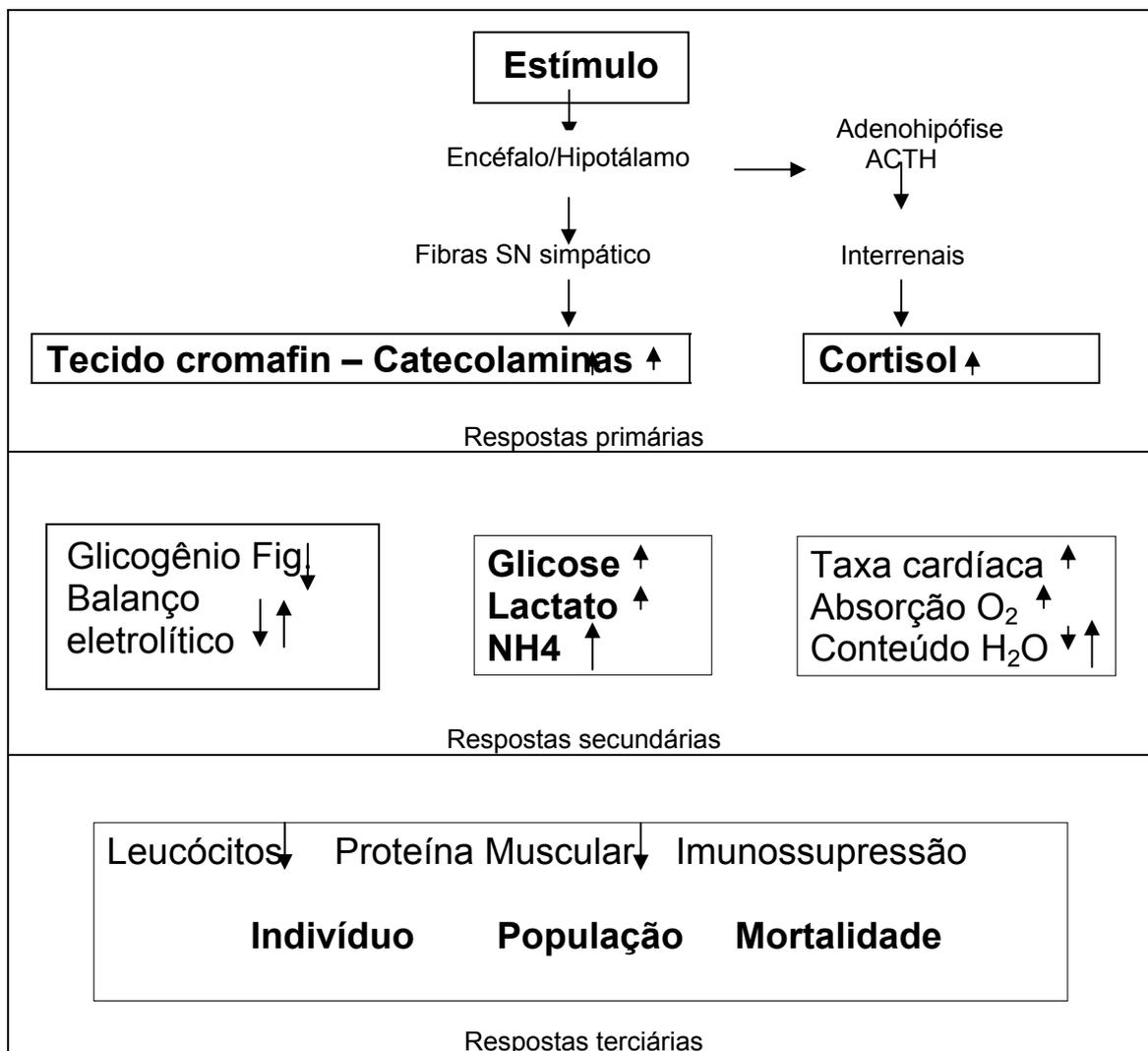


Figura 1. Esquema dos conjuntos das respostas fisiológicas de peixes submetidos ao estresse.

## 7. Referências bibliográficas

- ACKERMAN, P., FORSYTH, R., MAZUR, C., IWAMA, G. Stress hormones and cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, p. 327-336, 2000.
- ACKERMAN, P., IWAMA, G. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, p. 173-180, 2001.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 1<sup>a</sup> Edição, Editora UFSM. Santa Maria, 2002, 211 p.
- BARRETO, R., VOLPATO, G. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. **Behavioural Process**, v. 66, p. 43-51, 2004.
- BOYD, C.E. **Water Quality Management for Pond Fish Culture**. Developments in Aquaculture and Fisheries Science 9. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1982, 456 p.
- BURTON, V., MITCHELL, H., YOUNG, P., PETERSEN, N. Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Biology**, v.8, n. 8, p. 3550-3552, 1988.
- CARNEIRO, P.C.F., URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) during transport. *Aquaculture Research*, v. 32, 2001a, p. 297-304.
- CARNEIRO, P.C.F., URBINATI, E.C. Plasma electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 11, n. 4, 2001b, p. 1-13.

- CASTAGNOLLI, N. 1992. **Piscicultura de água doce**. 1ª Edição, Funep, Jaboticabal, 1992. 189 p.
- CECCARELLI, P.S., SENHORINI, J.A. *Brycon*: Viabilização da Produção de Alevinos. **Panorama da Aquicultura**, Maio-Junho, p. 10-11, 1996.
- CYRINO, J.E.P., CASTAGNOLLI, N., PEREIRA-FILHO, M. Digestibilidade da proteína de origem animal e vegetal pelo matrinxã (*Brycon cephalus* GUNTHER, 1869) (Eusteiostei, Characiformes, Characidae) In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA**, 4, 1986, Cuiabá, Anais... Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, Funep, 1986, 49-62.
- ESTEVES, F. **Fundamentos de Limnologia**. Ed. Interciência- Finep, Rio de Janeiro, 1988, 575p.
- GOMES, L.C., BALDISSEROTTO. B., SENHORINI, J.A. Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of the matrinxã, *Brycon cephalus* (Characidae), in ponds. **Aquaculture**, v. 183, p. 73-81, 1999.
- GOULDING, M. **The fishes and the forest: explorations in Amazonian Natural History**. University of California Press, Berkeley, 1980, 200 p.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. **Journal of Fish Biology**, v. 10, p. 191-195, 1986.
- HOCHACHKA, P.W. **Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance**. Harvard University press, Cambridge, 1980, 181 p.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Benzocaína como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Boletim Técnico do Cepta**, v. 15, p. 23-30, 2002.

- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C. MORAES, G. Clove oil as anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 563-565, 2004.
- IWAMA, G., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge University Press, 1997. 432 p.
- IWAMA, G., AFONSO, L., TODGHAM, A., ACKERMAN, P., NAKANO, K. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, 2004.
- JOPLIN, K., YOCUM, G., DENLINGER, D. Cold shocks elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. **Journal of Insect Physiology**, v.36, n. 11, p. 825-834, 1990.
- KUBITZA, F. **Técnicas de Transporte de Peixes Vivos**. Aqua & Imagem, Campo Grande MS, 1998. 44p.
- MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F., DONALDSON, E.M. Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with a General Review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p. 201-212, 1977.
- MCDONALD, G., MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B.(Eds.) **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge University Press, 1997. 432 p.

- MENDONÇA, J.O.J., SENHORINI, J.A., FONTES, N.A., CANTELMO, O.A. 1993. Influência da fonte proteica no crescimento do matrinxã *Brycon cephalus* GUNTHER, 1869 (TELEOSTEI, CHARACIDAE) em viveiros. **Boletim Técnico do Cepta**, v. 6, n. 1, p. 51-57, 1993.
- MENDONÇA, J.O.J. 1994. Criação de espécies do gênero *Brycon* no Cepta. **Anais do I Seminário sobre criação do gênero *Brycon***. Pirassununga 05 e 06 de Julho de 1994. p. 31-48.
- MOMMSEN, T., VIJAYAN, M., MOON, T. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.
- NAHARA, M. 1994. Pesquisas sobre a criação de espécies do gênero *Brycon* no Instituto de Pesca. **Anais do I Seminário sobre criação do gênero *Brycon***. Pirassununga 05 e 06 de Julho de 1994. pp. 5-8.
- NUNAMAKER, R., DEAN, V., MURPHY, K., LOCKWOOD, A. Stress protein elicited by cold shock in the biting midge *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth and Jones. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113B, p. 73-77, 1996.
- PICKERING, A.D. **Stress and fish**. In Pickering, A.D. (Ed) Academic Press. 1981. 220p.
- PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University press, 1981. p. 119-144.
- PIMENTA, A.M.C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 192, 16-22, 2003.

- PROENÇA, C.E.M., Bittencourt, P.R. **Manual de piscicultura tropical**. Brasília: Ibama – Diretoria de Incentivo à Pesquisa e divulgação. 1994. 196 p.
- ROUBACH, R., GOMES, L., VAL, A. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS 222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã *Brycon cephalus*. **Acta amazonica**, v. 31, n. 1, p. 159-163, 2001.
- SAINT-PAUL, V. Potential for aquaculture of south american freshwater fish: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240. 1986.
- SCHMITTOU, H. **Produção de peixes em alta densidade em tanques-rede de pequeno volume**. Trad. Eduardo Ono. Campinas: ASA. 1997. 77 p.
- SCORVO-FILHO, J.D. Panorama da Aqüicultura Nacional, 2002. Capturado em 01 out 2004. **Online disponível na internet**  
[www.acaq.org.br/arquivos/Panorama da aquicultura nacional.PDF](http://www.acaq.org.br/arquivos/Panorama_da_aquicultura_nacional.PDF)
- SURESH, A.V. LIN, K.C. Effect of stocking density on water quality on a production of red tilapia in recirculated water system. **Aquaculture Engeneering**, v. 11, p. 1-22, 1992.
- TANCK, M., BOOMS, G., EDING, E., WENDELAAR BONGA, S., KOMEN, J. Cold shocks: a stressor for common carp. **Journal of Fish Biology**, v 57, p. 881-894, 2000.
- URBINATI, E.C., CARNEIRO, P. Metabolic and hormonal responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) to transport stress under influence of benzocaine. during transport. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 16, n. 1, p.75-85, 2001.

VIJAYAN, M.M., PEREIRA, C., KRUYNSKI, G., IWAMA, G. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in 2 salmonids. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p. 101-108, 1998.

ZARATE, J., BRADLEY, T. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. **Aquaculture**, v. 223, p. 175-187, 2003.

## **OBJETIVO DO PRESENTE ESTUDO**

Avaliar as principais respostas do matrinxã aos agentes estressores presentes nas unidades de piscicultura. Foram mensuradas respostas fisiológicas ao estresse, simulando-se então o manuseio direto de peixes vivos. Procurou-se assim conhecer mais aspectos biológicos do matrinxã, bem como esclarecer ou propor alternativas para o manejo dessa espécie.

## **ABORDAGENS ESPECÍFICAS**

1. Estudo do conjunto de estímulos adversos ao matrinxã, presentes no cotidiano dos cultivos intensivos.
2. Mensuração das principais respostas ao estresse através do uso de diferentes ferramentas dos estudos de fisiologia de peixes.
3. Avaliação das principais técnicas de laboratório, utilizadas nas pesquisas de estresse para o matrinxã.
4. Avaliação do uso dos anestésicos benzocaína, fenoxietanol e eugenol no manuseio de juvenis de matrinxã através do:
  - 4.1. Estudo de viabilização de uso.
  - 4.2. Estudo de respostas cardíacas e respiratórias a estes anestésicos.
  - 4.3. Estudo de respostas fisiológicas a estes anestésicos.
5. Avaliação do uso de condicionadores como o sal marinho e o óleo de cravo para o transporte de juvenis de matrinxã.
6. Avaliação dos efeitos fisiológicos e celulares do choque térmico no matrinxã.

7. Aprimoramento dos protocolos de campo e a proposição de novas abordagens técnicas e científicas relacionadas ao cultivo do matrinxã.

## CAPÍTULO 1

### Ferramentas para o estudo do estresse em matrinxã

**Resumo** - As respostas fisiológicas dos peixes aos diferentes estímulos adversos à homeostase fazem parte do grande conjunto dos ajustes e adaptações dos organismos a diferentes estressores, que podem ter origem ambiental ou imposta pelo homem. Muitos estudos em biologia de peixes fazem uso dessas respostas com a finalidade de se mensurar ou avaliar os efeitos de determinado agente estressor. O Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos vem trabalhando no sentido de responder questões de cunho aplicado à aquicultura e a ecotoxicologia. Apresentamos no presente estudo as principais ferramentas utilizadas na detecção das respostas ao estresse do matrinxã. Os métodos são abordados brevemente para a determinação de parâmetros sanguíneos de hematócrito, hemoglobina total e número de células vermelhas. Variáveis plasmáticas como cortisol, glicose, açúcares totais, lactato, amônia, íons (sódio, potássio e cloreto) são também indicadas. Ainda métodos para a quantificação do glicogênio hepático e muscular, bem como as alterações nas expressões das proteínas de estresse (Hsp-70) estão abordadas.

**Palavras-chave:** parâmetros sanguíneos, plasmáticos, glicogênio, Hsp-70.

**Abstract** – METHODS FOR STRESS STUDIES IN MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*). The fish stress studies concern the fish responses to different stressors that may be imposed by the men (handling and transport for example)

or consequence of environmental changes as decreases in the water temperature and dissolved oxygen concentration. In this way, the physiological, biochemical, and cellular stress responses are very useful tools for fish biology research, which approaches depend entirely on the questions raised from the different conditions of field and laboratory. The adaptive Biochemistry Lab has worked along the years researching the main fish responses to stressors from environment and aquacultures. In this chapter, we present the methods for measuring the fish stress imposed by several adverse stimuli. Hematological parameters as hematocrit, total hemoglobin and red blood cells number are shown here. Methods for determining plasma variables of cortisol, glucose, lactate, total ammonia, ions (sodium, chloride, and potassium) are also described. In addition, hepatic and muscular glycogen and stress proteins (HSP-70) methods are briefly cited.

**Key words:** matrinxã, fish, stress, studies, methods.

## 1. Introdução

Os estudos dos ajustes e adaptações dos peixes a diferentes mudanças ambientais têm sido assunto de grande importância no Brasil, onde a grande diversidade da fauna e da flora motivam muitos pesquisadores a buscar respostas concernentes às relações existentes entre os peixes, o ambiente e a ação do homem.

Os ajustes dos peixes às diferentes situações do ambiente podem ser muitas vezes responsáveis pela sobrevivência e posteriormente pela perpetuação da espécie em determinado ecossistema ao longo de sua história

evolutiva. Dessa forma, o estudo da capacidade em responder a alterações incomuns aos padrões fisiológicos e comportamentais passa a ser de grande importância, pois pode esclarecer muitos aspectos biológicos dos peixes.

As respostas dos peixes a alterações do ambiente são em função direta de fatores externos, que podem ser limitantes ou não, de os graus de tolerância de cada espécie. Dessa forma, os estudos das principais respostas fisiológicas em peixes podem esclarecer muitas questões da biologia, bem como correlacioná-las aos aspectos econômicos envolvidos em determinada atividade (pesca e piscicultura).

O matrinxã é uma espécie que se enquadra perfeitamente nesse perfil, pois apresenta aspectos de sua biologia ainda sem respostas e tem grande importância social e econômica nas regiões pertencentes à Bacia Amazônica. Nas demais localidades, a importância do matrinxã está principalmente relacionada à exploração comercial em cativeiro com a finalidade de comercialização através de meios diversos como a pesca esportiva.

O presente trabalho visa apresentar as principais ferramentas utilizadas nos estudos dos ajustes e adaptações do matrinxã submetido a estímulos adversos à homeostase, presentes em situações de criação intensiva. Cabe ressaltar que esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos, que conta também com a colaboração de outros departamentos da Universidade e de outros institutos de pesquisas como o Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF/UFSCar) e o Institute for Marine Biosciences do National Research Council of Canada (IMB/NRC-CNRC).

## **2. Instalações e coleta de material biológico**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução, que conta com 8 tanques de 2 m<sup>3</sup> e 30 tanques de 250 L em sistema fechado de água circulante. Juvenis de matrinxã foram submetidos aos estímulos estressantes de choque térmico, manuseio, anestesia e transporte.

As amostragens de peixes, ao longo dos desenhos experimentais, foram realizadas com puçás. Imediatamente após a coleta os peixes eram sacrificados através de perfuração da parte superior da cabeça com tesoura bem afiada. Amostras de sangue foram coletadas com seringas devidamente heparinizadas (Liquemine® 5000 UI/ml). As alíquotas de sangue eram centrifugadas a 12.000 x g por 3 min para obtenção de plasma, que era congelado em nitrogênio líquido para posteriores análises.

Porções de brânquias, fígado, músculo branco foram também coletadas e congeladas em nitrogênio líquido.

## **3. Parâmetros hematológicos**

### Hematócrito

A porcentagem de células vermelhas no sangue era determinada pela técnica de centrifugação do micro-hematócrito (Collier, 1944). Tubos capilares contendo sangue transferidos de seringas heparinizadas eram fechados em uma das extremidades com massa e colocados em centrífuga de micro-hematócrito a 12.000 x g por 3 minutos. Os valores de hematócrito eram lidos em cartão de leituras de hematócrito da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Os valores de hematócrito foram expressos em %.

### Hemoglobina

As concentrações de hemoglobina foram determinadas de acordo com o método da cianometahemoglobina (Drabkin, 1948). Eram utilizados 10 µl de sangue total de cada amostra, diluídos em 2 ml de Drabkin, seguida de homogeneização e leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

### Contagem das células vermelhas do sangue (RBC)

Alíquotas de sangue (10 µl) eram misturadas em 2 ml de solução-citrato formol e agitadas para contagem do número de células vermelhas. Utilizavam-se 10 µl da mistura sangue-solução de citrato-formol em câmara de Neubauer (Lima *et al.*, 1969).

### Volume corpuscular médio (VCM)

O cálculo do volume corpuscular médio foi efetuado a partir dos valores de hematócrito e RBC (Lima *et al.*, 1969).

$$\text{VCM}_{\mu^3} = \text{hematócrito} \times 10 / \text{RBC}_{\text{milhões/mm}^3}$$

### Hemoglobina corpuscular média (HCM)

O cálculo dos valores de hemoglobina corpuscular média foi feito a partir dos valores de hemoglobina total e RBC (Lima *et al.*, 1969).

$$\text{HCM}_{\text{pg}} = \text{Hb}_{\text{g\%}} \times 10 / \text{RBC}_{\text{milhões/mm}^3}$$

### Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

O cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média foi feito a partir dos valores de hemoglobina total e hematócrito (Lima *et al.*, 1969).

$$\text{CHCM}_{\%} = \text{Hb}_{\text{g}\%} \times 10 / \text{hematócrito } \%$$

#### **4. Parâmetros plasmáticos**

##### Cortisol

Alguns ensaios de cortisol plasmático foram realizados por radioimunoensaio em contador de raios beta no Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os demais ensaios do cortisol plasmático foram realizados por método enzimático *Elisa* (Ackerman *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2001), com o kit Neogen Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) lido em 450 nm em “microplate reader” acoplado ao software Softmax Pro.

##### Glicose

As concentrações de glicose plasmática foram determinadas pelo método da glicose-oxidase (Trinder, 1969; Cooper, 1973) em “microplate reader” com leitura de absorvância (525 nm). Os cálculos de concentração em mg/dL foram feitos com o software Softmax Pro. Os ensaios foram feitos com adição de 10 µl de plasma em cada poço seguido da adição de 190 µl de reagente reconstituído para determinação de glicose plasmática da Sigma®. Curvas padrão a partir de soluções conhecidas de glicose foram realizadas nos ensaios de glicose plasmática.

### Açúcares totais

Alíquotas de plasma (100 µl) foram desproteinizadas com 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 20% e centrifugadas a 12.000 x g por 3 min. Alíquotas apropriadas do sobrenadante foram ensaiadas para determinações dos teores de açúcares totais através de método colorimétrico (Dubois *et al.*, 1960). O ensaio consiste na reação de alíquotas de extratos desproteinizados, com Fenol 4.1% mais ácido sulfúrico, seguido de leitura de absorvância em espectro fotômetro a 480 nm. Alíquotas de concentração conhecida de glicose foram utilizadas como padrões para o cálculo das concentrações de açúcares totais.

### Lactato

Amostra de plasma (100 µl) eram desproteinizadas em 1 ml de TCA 20 % e centrifugadas a 12.000 x g por 3 min. Alíquotas de sobrenadante eram adicionadas de sulfato de cobre 4 % e ácido sulfúrico com agitação lenta. Em seguida, era adicionado p-fenilfenol 1,5 % em NaOH 0,5 N sem agitação e após 15 min, os tubos eram incubados em banho-maria a 100 °C e a densidade óptica era determinada em 570 nm (Harrower & Brown, 1972). Alíquotas de solução padrão de lactato de sódio eram feitas em paralelo para obtenção dos valores de absorvâncias em soluções de concentração conhecidas, utilizadas na determinação das concentrações nos tecidos.

### Amônia

Primeiramente, amostras de plasma (100 µl) eram desproteinizadas em 1 ml de TCA 20% e centrifugadas a 12.000 x g por 3 min. Alíquotas do

sobrenadante eram submetidas aos ensaios colorimétricos pela adição do reativo de Nessler (Imbralab), com incubação a temperatura ambiente por 20 min. Seguia-se então a leitura da absorvância a 420 nm comparada com padrão de concentração conhecida de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Gentzkow & Masen, 1942), para se calcular o conteúdo de amônia total.

### Íons (Na, K e Cl)

Amostras de plasma (100  $\mu\text{l}$ ) eram diluídas em água deionizada (1:100) e os teores de sódio (Na) e potássio (K) plasmáticos determinados em fotômetro de chama Digimed (modelo DM-61), calibrado com solução padrão (DMS-13A) contendo 140 mEq de  $\text{Na}^+$  e 5 mEq de  $\text{K}^+$ .

Alíquotas menores do restante dos ensaios de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  eram submetidas aos ensaios de cloreto através de método colorimétrico adaptado da APHA (1980). O ensaio consiste na reação de alíquotas de plasma diluído com tiocianato de mercúrio diluído em etanol, nitrato de ferro e ácido nítrico seguido de leitura de absorvância a 480 nm. Alíquotas de concentrações conhecidas de NaCl foram também ensaiadas para obtenção dos valores de absorvâncias utilizadas nos cálculos da concentração de cloreto no plasma.

### Proteína total

Amostras de plasma (10  $\mu\text{l}$ ) foram submetidas à dosagem de proteína total, segundo o método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951). O ensaio consiste em reação de alíquotas de plasma diluído com carbonato de sódio 2 % em hidróxido de sódio 0,1 N, sulfato de cobre 1 %, tartarato duplo de sódio e potássio e reativo de folin (Sigma®), seguida de leitura de absorvância em 660

nm. Padrões de caseína de concentração conhecida eram também ensaiados em paralelo, para obtenção das absorvâncias utilizadas nos cálculos do teor proteínico total no plasma.

## **5. Parâmetros tissulares**

### Glicogênio hepático

O glicogênio hepático foi determinado segundo Bidinotto *et al.* (1997). Resumidamente, a determinação consiste em digerir amostras de fígado (50 mg) em condições alcalinas (1ml de KOH 6 N) a 100°C por 2 a 3 min. Após a digestão, alíquotas são retiradas e adicionadas de 2 ml de etanol mais 0,1 ml de sulfato de potássio 10 %, para precipitação do glicogênio através de centrifugação a 3.000 x g por 3 min. O álcool é descartado e o precipitado ressuspenso com 2 ml de água destilada. Alíquota dessa ressusensão é submetida ao ensaio do teor de açúcares totais (Dubois *et al.*, 1960), podendo-se assim expressar o glicogênio em  $\mu$ moles de glicosil-glicose/ mg de tecido.

### Proteínas de Choque Térmico (Hsp)

Porções de tecidos (aproximadamente 50 mg) foram homogeneizadas em 1 ml de solução tampão (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% SDS, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1  $\mu$ M pepstatin A, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1  $\mu$ M leupeptin, e 0,01  $\mu$ M aprotinin). Alíquotas desse extrato eram diluídas para que os teores de proteína total nos tecidos (fígado, brânquia, músculo branco e células vermelhas do sangue) fossem determinados de acordo com o método do ácido bicinônico (BCA)

(Smith *et al.*, 1985), adaptado para leitura em microplate reader a 550 nm, acoplado ao software Softmax Pro. Após a determinação da concentração de proteína total nos tecidos, as amostras homogeneizadas foram diluídas de forma a se ter alíquotas de mesma concentração protéica (1 ug/ul) para o ensaio da expressão das proteínas de estresse (hsp-70).

A expressão das proteínas de estresse era realizada de acordo com Laemmli (1970). Primeiramente, foram montados os géis SDS-Page de poliacrilamida (4% stacking e 12% separating gels em aparato Mini-Protean II para electrophoresis cell da Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cada gel de 10 células recebia respectivamente 3 marcadores e 7 amostras, sendo submetido a uma ddp de 75 V por 15 min. e posteriormente 150 V por 1 h. Posteriormente, os géis eram submetidos à técnica de Western Blotting por 30 min. a uma ddp de 15 V para transferência das bandas protéicas para membranas de nitrocelulose. Os três marcadores utilizados foram: “precision marker” (Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA), “magic marker” (Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA) e um controle positivo produzido a partir de células de gônadas de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) submetidas a choque térmico quente, qual sabidamente induziu aumento na expressão de hsp-70 (rainbow trout gonad (heat shocked) cell lysates – Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada). A eficiência de transferência das bandas para a membrana de nitrocelulose foi verificada através de solução de Ponceau, quando após seguiu-se os passos da imunodeteccção da proteína de estresse hsp-70. Testaram-se nessa etapa os anticorpos da Stressgen<sup>®</sup> e da Sigma<sup>®</sup>.

Os anticorpos da Stressgen<sup>®</sup> eram anticorpos purificados de truta: A/b primário (rabbit anti-hsp70/hsc70 - polyclonal antibody), A/b secundário (específico para o primário – anti-rabbit IgG:AP). Já os anticorpos fabricados pela Sigma<sup>®</sup> (H5147 Sigma, Saint Louis, MI, USA) são produzidos a partir de ratos: primário (monoclonal anti-heat shock protein 70), secundário (anti-mouse IgG). Os anticorpos que apresentaram os melhores ensaios na detecção das proteínas de estresse foram os anticorpos primários e secundários da Sigma<sup>®</sup>, produzidos a partir de ratos albinos (monoclonal anti heat shock protein 70), que foram utilizados para o estudo das proteínas de estresse em matrinxã.

Após a transferência das bandas para as membranas de nitrocelulose, essas foram incubadas por 35 minutos em anticorpo primário monoclonal anti-hsp 70 na diluição 1:10.000. Este anticorpo reconhece os níveis constitutivos e os induzidos da hsp 70. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução tampão tris-salina de tween-20 (TBS T) e incubadas com o anticorpo secundário (goat anti-mouse peroxidase conjugate, na diluição de 1:10.000, A-9917 Sigma) por 35 min. Ambos os anticorpos foram diluídos em solução de leite em pó 2% em TBS. A intensidade da ligação dos anticorpos na membrana foi detectada através de quimioluminescência (ECL – Western blotting detection reagents RPN 2108, Amershan Biosciences, UK) e quantificada então as intensidades de cada banda por densitometria (Bio-Rad multi-analyst software, Bio-Rad Laboratories).

## **6. Preparação e envio do material biológico para o Canadá**

Todo material biológico coletado para estudo das proteínas de estresse hsp-70 e algumas determinações de cortisol e glicose do plasma foram estocados a – 80 °C e depois embalado em recipiente de isopor. Utilizou-se gelo seco no interior da embalagem, para que se despachasse o material biológico através da Federal Express (Fedex - 841900313461) para o Institute for Marine Biosciences (IMB) do National Research Council of Canada (NRC). O envio do material biológico foi realizado de acordo com os procedimentos legais, requeridos pelo Ministério do Meio Ambiente através do Ibama (0.2000.002019/03), que nos autorizou a enviar amostras de material biológico para o Canadá através do ofício nº 010/03/Assessoria/Presidência-Ibama com ciência do Reitor da Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. Oswaldo Batista Duarte Filho.

## **7. Considerações**

Muitos aspectos da biologia dos peixes tropicais podem ser avaliados através das ferramentas apresentadas no presente estudo. Cabe então aos pesquisadores o direcionamento e o enfoque das principais perguntas e respostas das espécies de peixes em questão, bem como os agentes causadores dos distúrbios à homeostase, que têm origens diversas. Muitas outras ferramentas como as alterações em atividades de enzimas e a expressão de proteínas são também utilizadas, sendo as eficiências avaliadas de acordo com as potencialidades e aplicações nos estudos dos ajustes e adaptações fisiológicas em peixes.

## 8. Referências bibliográficas

ACKERMAN, P., FORSYTH, R., MAZUR, C., IWAMA, G. Stress hormones and cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, p. 327-336, 2000.

APHA. **Standard methods for determinations of water and wastes**. 12 ed. Washington, DC: Joint Editorial board, 1980, 554 p.

BASU, N., NAKANO, T., GRAU, E.G., IWAMA, G.K. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 97-105, 2001.

BIDINOTTO, P.M., SOUZA, R.H.S., MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. **Boletim Técnico do Cepta**, v. 10, p. 53-60, 1997.

COOPER, G.R. Methods for determining the amount the glucose in blood. **Critical Review in Clinical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 4, p. 101-145, 1973.

DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. **American Journal of Medical Science**, v. 215, n. 1, p. 110-111, 1948.

DUBOIE, M.G., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-358, 1960.

GENTZKOW, C.J., MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 143, p. 531-544, 1942.

- HARROWER, J.R., BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, n. 5, p. 224-228, 1972.
- LAEMMLI, I.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LOWRY, D.H., ROSENBROUGH, N.J., FAR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.
- LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J., CANÇADO, J. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 4<sup>th</sup> edition. Guanabara Koogan, R.J. 1969. 653 p.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTENR, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with the alternative oxygen acceptor. **Analytical Clinic Biochemistry**, v. 6, p. 24-25, 1969.

## CAPÍTULO 2

### **Avaliação da eficiência anestésica do eugenol, benzocaína e fenoxietanol para o manuseio de juvenis de matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): tempo de indução à anestesia**

**Resumo** - A excessiva movimentação dos peixes durante o manuseio é um fator negativo que os predispõe a riscos de acidentes e ferimentos na superfície do corpo. Conseqüentemente, os animais ficam mais vulneráveis à manifestação de patógenos e observa-se eventualmente elevada taxa de mortalidade. Assim, o uso de anestésicos no manejo de peixes como o matrinxã tem despertado grande interesse nas unidades de piscicultura e estações de pesquisas. Essa espécie apresenta extrema agilidade e movimentação durante o manuseio. Entretanto, são necessárias ainda mais informações básicas para o uso de anestésicos no manejo dessa espécie, tais como doses, efeitos colaterais e tempo de carência. O presente estudo buscou padronizar o uso dos anestésicos eugenol, benzocaína e fenoxietanol para o matrinxã, mensurando-se o tempo de indução à anestesia em relação a diferentes doses. Todos os anestésicos foram bastante eficientes, sendo crescentemente classificado o poder anestésico: fenoxietanol, benzocaína e eugenol.

**Palavras-chaves:** matrinxã, *Brycon cephalus*, anestésicos, eugenol, benzocaína, fenoxietanol.

**Abstract** – STANDARDIZATION IN THE USE OF THE ANESTHETICS EUGENOL, BENZOCAINE, AND 2-PHENOXYETHANOL FOR FIELD PROCEDURES IN MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*). The excessive movements that fish does during several field procedures are negative factors that risk fish to accidents and injuries. Consequently, fish may be vulnerable to pathogens and mortality. In this way, the use of anesthetics in fish as matrinxã has been interesting among fish farmers and researchers. However, informations about anesthetics are still necessary in matrinxã concerning anesthetics concentrations, collateral effects, risks to men and environment. The present work evaluated the times to induce anesthesia in order to standard the use of eugenol, benzocaine, and 2-phenoxyethanol for matrinxã. All anesthetics were quite efficient to induce anesthesia, and recoveries were suitable for matrinxã. Anesthetics efficiencies were classified: 2-phenoxyethanol, benzocaine and eugenol. Eugenol induced the matrinxã anesthesia in the lowest concentrations.

**Key words:** matrinxã, *Brycon cephalus*, anesthetics, eugenol, benzocaine, 2-phenoxyethanol.

## 1. Introdução

Durante as diversas práticas realizadas nas unidades de produção e pesquisas em biologia de peixes é necessária a anestesia dos indivíduos, devido à movimentação excessiva que apresentam, quando acudados nas redes, puçás e caixas de manejo. Espécies como o matrinxã (*Brycon cephalus*) são naturalmente muito ativas e relativamente agressivas. O manuseio desta espécie em cativeiro é bastante trabalhoso com várias conseqüências

indesejáveis. O manuseio do matrinxã sem a devida cautela o predispõe a ferimentos na superfície do corpo, perda de escamas e posterior agressão entre os peixes. Esse fato pode ainda favorecer a manifestação de organismos patogênicos ou também provocar a morte de peixes (Durvile & Collet, 2001).

O matrinxã, peixe originário da bacia amazônica, é cultivado em todo o país, apresentando bons índices zootécnicos de crescimento com aproveitamento satisfatório da alimentação artificial, tanto de origem animal quanto vegetal (Cyrino *et al.*, 1986). Além disso, sua aceitação pelos consumidores é bastante favorável nos mercados dos estados da região Amazônica. Nas demais estados brasileiros, é grande sua importância nos estabelecimentos de comercialização de peixes vivos através do sistema pesque-pague (Carneiro & Urbinati, 2001).

Vários produtos como a benzocaína, a tricafina metanosulfonato (MS-222), o fenoxietanol e o eugenol são descritos como anestésicos para as diversas espécies de peixes tropicais (McCarter, 1992; Gomes *et al.*, 2001; Roubach *et al.*, 2001; Sladky *et al.*, 2001). Estas espécies necessitam que as doses sejam empregadas em concentrações mínimas, para que ocorra a adequada anestesia e eficiente recuperação dos animais submetidos aos banhos anestésicos. O critério de escolha de um anestésico tem sido usualmente a disponibilidade e o preço (Iwama & Ackerman, 1994).

Diversos são os estágios de anestesia descritos na literatura (Woody *et al.*, 2002), classificados de acordo com os graus de perda de equilíbrio e alterações na frequência dos batimentos operculares (Tabela 1). Dessa forma, a determinação do intervalo de tempo adequado para que os peixes atinjam

determinados estágios de anestesia é de fundamental importância para o correto planejamento de determinada manipulação de peixes.

O presente estudo buscou padronizar o uso dos anestésicos eugenol, benzocaína e fenoxietanol para o matrinxã através da determinação do tempo de indução à anestesia em diferentes doses. Monitorou-se também a estocagem dos peixes antes e após os ensaios, a fim de que todos os passos empregados no campo fossem simulados adequadamente.

## **2. Material e métodos**

Os peixes utilizados foram obtidos a partir de reprodução artificial em unidade de produção comercial de alevinos, na Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP. Os animais foram mantidos nas instalações do Laboratório de Bioquímica Adaptativa da Universidade Federal de São Carlos por cinco meses. Os peixes foram estocados em sistema de cultivo superintensivo em tanques circulares com capacidade para 2.000 L cada, com circulação fechada de água e aeração constante. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial contendo 30% de proteína bruta e 3.500 kcal de energia bruta por quilograma de ração.

### Desenho experimental

Três lotes de aproximadamente 90 peixes (Lote eugenol:  $86,9 \pm 40,0$  g,  $18,7 \pm 2,2$  cm; benzocaína:  $112,1 \pm 20,0$  g,  $24,2 \pm 1,4$  cm; fenoxietanol:  $107,0 \pm 25,9$  g,  $20,3 \pm 1,6$  cm) foram utilizados no presente estudo, sendo realizados

assim três experimentos distintos, testando-se separadamente o eugenol nas doses de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 mg/L; a benzocaína nas doses de 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 mg/L; e o fenoxietanol nas doses de 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 e 600 mg/L. O protocolo para o teste com cada anestésico seguiu através da captura de peixes de uma caixa (lote) para a realização dos banhos em soluções anestésicas, que foram conduzidas a partir das concentrações menores para as maiores, sendo trocada a água dos aquários após o teste de cada concentração. As doses mínimas foram determinadas previamente, expondo-se peixes aos anestésicos e observando-se a ocorrência do estágio 3 de anestesia (Tabela 1). Dessa forma, adotou-se como dose mínima em cada experimento subsequente a concentração, da qual induziu anestesia do matrinxã em no máximo 10 min.

Nove peixes foram utilizados no teste de cada concentração, que foi executado utilizando-se três aquários com capacidade de 4 L cada, sendo que três peixes foram individualmente anestesiados em cada aquário, onde era possível que se observasse o momento exato em que os peixes atingiam o estágio 3 de anestesia, que, conforme Woody *et al.* (2002) (Tabela 1), é descrito como a perda total de equilíbrio e a incapacidade de retornar a posição normal de nado. O tempo de indução ao estágio 3 de anestesia em juvenis de matrinxã foi mensurado, utilizando-se três cronômetros (um cronômetro para cada aquário), que eram acionados no momento em que se colocava os peixes nos aquários e interrompidos no momento exato em que os peixes perdiam totalmente o equilíbrio na coluna de água. Ao atingir esse estágio de anestesia, cada peixe foi submetido à biometria e transferido para outro tanque de criação sem peixes, sendo respeitada a origem de cada peixe anestesiado com o

respectivo lote utilizado no teste de cada anestésico. As mesmas condições iniciais do trabalho foram respectivamente mantidas para os três lotes de peixes, que permaneceram em observação por mais 1 mês, quando foram devidamente contados para verificação de sobrevivência.

Os parâmetros físico-químicos de qualidade de água foram também monitorados (pH 6,8, temperatura  $25,7 \pm 0,9$  °C, oxigênio dissolvido  $5,66 \pm 0,07$  mg/l, e condutividade  $74,3 \pm 4,8$   $\mu$ S.cm), permanecendo assim dentro das condições ideais para o cultivo de organismos aquáticos (Arana, 1997).

Através do emprego dos programas Graphpad/Instat e Minitab, os dados foram analisados com teste de médias e ajuste de regressão exponencial, tendo sido adotado o nível de significância de  $P < 0,05$ .

### **3. Resultados**

Todos os peixes utilizados no presente estudo atingiram satisfatoriamente o estágio 3 de anestesia em menos de 10 min. O tempo de anestesia foi visivelmente decrescente de acordo com as doses progressivas dos anestésicos, mostrando também que as variações (desvio padrão da média) desse parâmetro decresceram nas concentrações mais altas. Assim, a medida que se aumentava a dose diminuía o tempo de indução ao estágio 3 de anestesia (em segundos), porém a partir das concentrações de 25 mg/L para o eugenol, 60 mg/L para a benzocaína e 400 mg/L para o fenoxietanol os tempos de indução a anestesia passaram a não apresentar diferenças significativas em

relação as doses mais altas, sendo que os peixes atingiam o estágio 3 de anestesia em aproximadamente 1 min.

As expressões matemáticas que descrevem o tempo de indução à anestesia em função das concentrações de eugenol (Figura 1), benzocaína (Figura 2) e fenoxietanol (Figura 3) permitiram a correta previsão do tempo de indução à anestesia de acordo com as diferentes doses.

Nenhum exemplar anestesiado ofereceu resistência ao manuseio, sendo todos os peixes facilmente pesados e medidos, indicando que o estágio de anestesia utilizado no presente estudo foi suficiente para a execução da biometria. Todos os peixes recuperaram-se dos procedimentos experimentais adequadamente, sendo que não se observou diferenças significativas no tempo de volta a posição normal de nado. Todos os peixes voltaram então a posição de equilíbrio na coluna de água em torno de 1 min. Além do mais, não foi observada mortalidade de peixes mesmo após decorrido 1 mês de cada experimento.

#### **4. Discussão**

Muitos são os anestésicos utilizados para se manusear peixes (Iwama & Ackerman, 1994; Ross & Ross, 1999), sendo apresentadas diversas vantagens no uso de cada um desses anestésicos. O eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol são bastante empregados no Brasil devido principalmente à boa disponibilidade no mercado (Roubach & Gomes, 2001).

O eugenol é um produto com uso clássico na odontologia, que uma vez misturado ao óxido de zinco, forma um excelente material de preenchimento temporário para dentes. Ainda, o eugenol apresenta outros usos na odontologia, devido a suas propriedades anti-sépticas com aplicações na composição de muitos produtos odontológicos. A indústria alimentícia produz a baunilha a partir de substâncias diversas, das quais um derivado do eugenol, o isoeugenol, faz parte desse conjunto (National Toxicology Program, 2002).

O eugenol em sua forma pura ou bruta como o óleo de cravo tem se mostrado bastante promissor como anestésico para o matrinxã (Inoue *et al.*, 2003), com bons resultados na diminuição das seqüelas da manipulação e transporte de peixes vivos, sendo ainda rapidamente eliminado dos tecidos dos peixes, podendo ser estes liberados no ambiente sem a necessidade de longos períodos de carência (Kildea *et al.*, 2004).

A benzocaína é um anestésico comum e barato para o manejo de peixes (Gomes *et al.*, 2001). Muitos técnicos da área de piscicultura adotam tal anestésico, que aparentemente não apresenta efeitos tóxicos, sendo, entretanto, recomendado o uso de luvas durante sua manipulação, pois em contato prolongado com a pele das mãos, pode produzir alguma sensação de perda temporária de sensibilidade nos dedos, e em alguns casos dermatites (Roubach & Gomes, 2001). A benzocaína também é rapidamente eliminada do organismo (Meinertz *et al.*, 1996), além de não apresentar características carcinogênicas (Gontijo *et al.*, 2003).

O fenoxietanol é um anestésico também bastante utilizado para se manipular peixes vivos, com bons resultados, embora sua disponibilidade seja um pouco baixa, com preços elevados, associados a algumas limitações na

importação (Roubach & Gomes, 2001). Ocorre ainda na literatura o relato de três casos de neurointoxicação por ação do fenoxietanol em trabalhadores de uma estação de salmonicultura, com sintomas de diminuição temporária de força nas mãos e perdas de funções cognitivas após exposições sucessivas a esse produto químico por períodos prolongados (Morton, 1990). No entanto, outro estudo indica que o fenoxietanol é rapidamente eliminado dos tecidos dos peixes, com meia vida de 30 min (Kojima *et al.*, 1987).

O uso de anestésicos em juvenis de matrinxã é necessário por ocasião da aplicação de injeções, suturas, obtenção de fotos, biometria e outras, pois a movimentação excessiva dos peixes pode causar acidentes ao redor de equipamentos como agulhas e bisturis, além do risco de queda dos peixes ao chão, podendo causar ferimentos diversos. O estágio 3 de anestesia adotado no presente trabalho foi satisfatório para a realização da biometria, que é uma das atividades de campo mais importantes, já que dados simples de peso e comprimento de peixes permitem um bom monitoramento da produção de biomassa em determinado período, bem como a avaliação geral do estado dos peixes.

Recentemente foi lançado no mercado de produtos para piscicultura um novo anestésico com princípio ativo derivado do eugenol, o isoeugenol (Aqui S), que já tem seu uso regulamentado em países como a Austrália e Nova Zelândia, sem a necessidade de período de carência, apresentando também resultados desejáveis no manuseio de peixes como a perca *Bidyanus bidyanus* e o bagre do canal *Ictalurus punctatus* (Kildea *et al.*, 2004; Small, 2004). Entretanto, existe ainda a necessidade de maiores esclarecimentos nas legislações para o uso de anestésicos para peixes, pois o único de uso

devidamente regulamentado é a triclaína metano sulfonate (MS-222), que, embora seja bastante eficiente para o matrinxã (Roubach *et al.*, 2001), apresenta elevado preço nos mercados internacionais, além de complicadas políticas de importação no Brasil. O MS 222 requer um período de carência de no mínimo 21 dias para que peixes expostos a esse químico possam ser consumidos ou liberados no ambiente (Meinertz *et al.*, 1996).

Os parâmetros de qualidade da água de temperatura, oxigênio dissolvido e pH apresentaram-se sempre dentro da faixa ideal para o cultivo do matrinxã (Arana, 1997). É bastante possível que, se alterando qualquer um desses fatores isoladamente ou em conjunto, a eficiência de cada anestésico estudado se altere. Dessa forma, admite-se que os banhos anestésicos sejam sempre realizados dentro das condições recomendadas de qualidade da água para o cultivo de peixes para a validação e aplicação de nossos dados nas condições de campo.

No presente estudo o eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol apresentaram-se bastante eficientes na imobilização do matrinxã, sendo o eugenol o mais eficiente, pois se necessitou de menores concentrações para que os peixes atingissem o mesmo estágio de anestesia em menores intervalos de tempo (aproximadamente 1 minuto). A benzocaína apresentou-se numa posição intermediária seguida pelo fenoxietanol. Os resultados permitem a correta previsão do tempo de indução à anestesia em função das concentrações dos anestésicos (Figuras 1, 2 e 3). Tais informações são de fundamental importância para se manipular juvenis de matrinxã, pois essas podem ser úteis para não expor os animais aos produtos químicos por mais

tempo que o necessário, ou também permitir que os técnicos de piscicultura possam planejar adequadamente o manuseio dos peixes.

Tabela 1. Características comportamentais dos peixes de acordo com os diferentes estágios de anestesia.

Estágio	Característica de comportamento
1	Desbalanço visível dos movimentos operculares
2	Perda parcial de equilíbrio e dificuldade em manter posição normal de nado, quando parado.
3	Perda total de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição vertical de nado (“barriga para cima”)
4	Ausência de reação a qualquer estímulo
Recuperado	Recuperação da posição normal de nado e da capacidade de nadar.

Fonte: Woody et al. (2002).

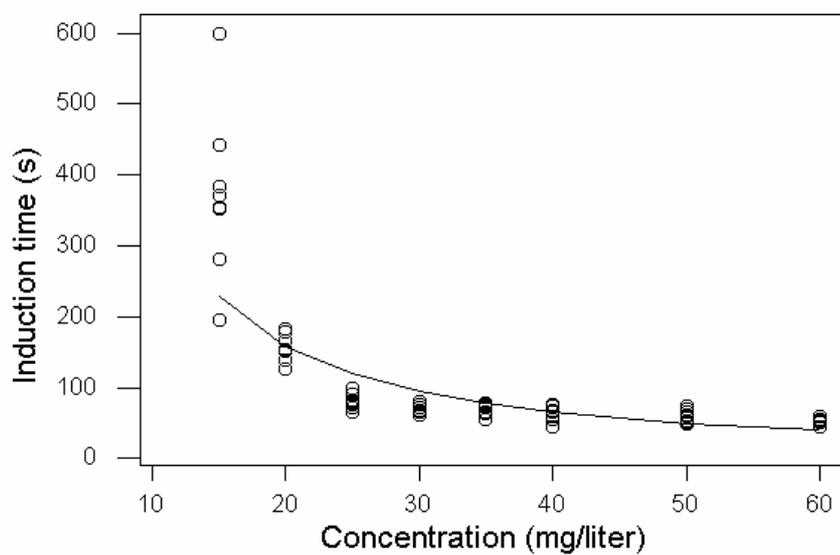


Figura 1. Tempo (s) de indução ao estágio 3 de anestesia (perda total de equilíbrio e incapacidade de retorno a posição normal de nado) por eugenol em juvenis de matrinxã.  $I = 103.855 C^{-1.273}$ . I – tempo de indução (s), C – concentração de eugenol (mg/liter). F = 225.643 and R-square = 0.760.

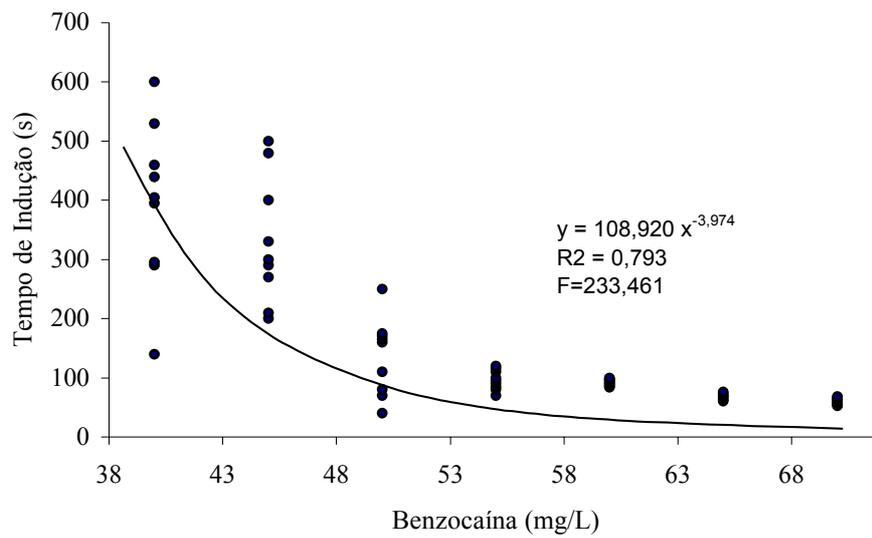


Figura 2. Tempo (s) de indução ao estágio 3 de anestesia (perda total de equilíbrio e incapacidade de retorno a posição normal de nado) por diferentes concentrações de benzocaína em juvenis de matrinxã.

Publicado em Inoue *et al.* (2002).

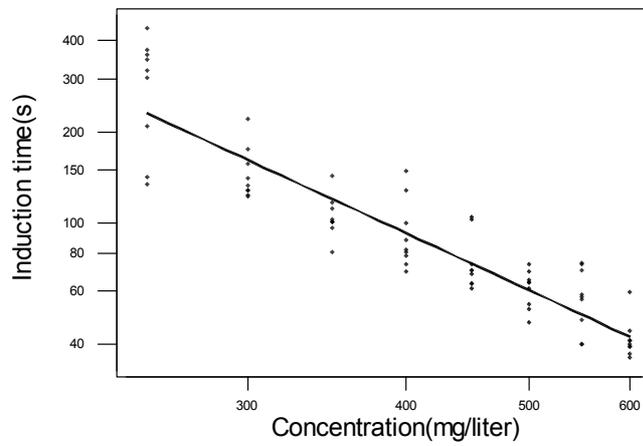


Figura 3. Arranjo matemático do efeito anestésico do fenoxietanol em juvenis de matrinxã.  $T = 10^{7.01} \times p^{-1.94}$ , sendo T=tempo de indução ao estágio 3 de anestesia (s) e p = concentração 2-phenoxyethanol (mg/liter). F = 355.660 and  $R^2 = 83.6 \%$ .

Publicado em Inoue *et al.* (2004).

## 5. Referências bibliográficas

- ARANA, L. **Princípios químicos e físicos de qualidade da água em aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Editora da UFSC, Florianópolis, 1997. 166 p.
- CARNEIRO, P.C.F., URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 297-304, 2001.
- CYRINO, J.E.P., CASTAGNOLLI, N., PEREIRA-FILHO, M. Digestibilidade da proteína de origem animal e vegetal pelo matrinxã (*Brycon cephalus* Gunther, 1869) (Eusteiostei, Characiformes, Characidae) In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA**, 4., 1986, Cuiabá. *Anais*. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso; Funep, 1986. p. 49-62.
- DURVILLE, P., COLLET, A. Clove oil used as anaesthetic with juvenile tropical marine fish. *SPC Live Reef. Fish Information Bulletin*, v. 9, p. 17-19, 2001.
- GOMES, L., CHIPPARI-GOMES, A., LOPES, N., ROUBACH, R., ARAUJO-LIMA, C. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001.
- GONTIJO, A., BARRETO, R., SPEIT, G., REYES, V., VOLPATO, G., SALVADORI, D. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, v. 534, p. 165-172, 2003.

- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Benzocaína como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Boletim Técnico do Cepta**. Pirassununga, v. 15, p. 23-30, 2002.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 563-565, 2004.
- IWAMA, G., ACKERMAN, A. Anaesthetics In: HOCHACHKA, P., MOMMSEN (Eds.) **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier Science, Amsterdam, v. 3. p. 1-15, 1994.
- KILDEA, M., ALLAN, G., KEARNEY, R. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and Aqui-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.
- McCARTER, N. Sedation of grass carp and silver carp with 2-phenoxyethanol during spawning. **Progressive Fish Culturist**, v. 54, p. 263-265, 1992.
- MEINERTZ, J., STEHLY, G., GINGERRICH, W. Pharmacokinetic of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraarterial dosing. **Aquaculture**, v. 148, p. 39-48, 1996.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Clove oil. Capturado em 23 mai. 2002. Online. Disponível na Internet <http://ntp-server.niehs.nih.gov/>

- MORTON, W.E. Occupational phenoxyethanol neurotoxicity: a report of three cases. **Journal of Occupational Medicine**, v. 32, p. 42-45, 1990.
- ROSS, L., ROSS, B. **Anesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. Blackwell Science, London, 1999, 157 p.
- ROUBACH, R., GOMES, L. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.
- ROUBACH, R., GOMES, L., VAL, A.L. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã, *Brycon cephalus*. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 1, p. 159-163, 2001.
- SLADKY, K., SWANSON, C., STOSKOPF, M., LOOMIS, M. LEWBART, G. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.
- SMALL, B.C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Aquaculture**, v. 238, p. 469-481, 2004.
- WOODY, C.A., NELSON, J., RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 340-347, 2002.

### Capítulo 3

#### **Avaliação da eficiência anestésica do eugenol, benzocaína e fenoxietanol para o manuseio de juvenis de matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): respostas cardiorrespiratórias**

**Resumo** – O uso de anestésicos no manuseio de peixes como o matrinxã tem sido assunto de grande interesse entre os técnicos da área de piscicultura e biologia de peixes, pois essa espécie movimenta-se vigorosamente durante qualquer manipulação, podendo ocorrer acidentes ao redor dos operadores e materiais pontiagudos como seringas e bisturis. O uso do eugenol, da benzocaína e do fenoxietanol como anestésicos para o matrinxã vem sendo bastante divulgado no país, sendo apontadas vantagens diversas no uso de cada um deles. Entretanto, as visíveis alterações na frequência dos batimentos operculares e a intensa movimentação que os peixes realizam nos primeiros instantes dos banhos anestésicos, evidenciam sinais de alterações cardiorrespiratórias que devem ser investigadas. O presente estudo avaliou as respostas cardiorrespiratórias do matrinxã submetido à anestesia através do eugenol, da benzocaína e do fenoxietanol. Assim foi avaliado o uso de cada um desses anestésicos sob o ponto de vista cardiorrespiratório. O eugenol e a benzocaína apresentaram-se satisfatórios para o matrinxã, ainda que tenham apresentado taquicardia e hiperventilação associadas à hipotensão e reduzidos valores de (%)  $V_{AMP}$  e  $V_{TOT}$ . O fenoxietanol resultou em claros sinais de hipóxia já nos primeiros instantes dos

banhos anestésicos, assim como sinais de bradicardia e hiperventilação associada à hipotensão e valores reduzidos de (%)  $V_{AMP}$  e  $V_{TOT}$ .

**Palavras-chaves:** matrinxã, *Brycon cephalus*, anestésicos, respostas, cardiorrespiratórias.

**Abstract** - CARDIO RESPIRATORY RESPONSES OF MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*) SUBMITTED TO THE ANESTHETICS EUGENOL, BENZOCAINE, AND 2-PHENOXYETHANOL. The use of anesthetics for field procedures in fish as matrinxã has been focused among biologists and aquaculture professionals lately. This species has intensive movements during handling that risk matrinxã to accidents and injuries that may consequently lead to mortality. Eugenol, benzocaine and 2-phenoxyethanol have been indicated for matrinxã handling, but clear cardio respiratory responses in addition to the intensive movements are observed during the anesthetics baths. The present work evaluated the main cardio respiratory responses of matrinxã to the anesthetics eugenol, benzocaine and 2-phenoxyethanol. Eugenol and benzocaine were suitable for matrinxã anesthesia that led fish to taquicardia and hyper ventilation associated with arterial hypotension and decrease in the (%)  $V_{AMP}$  and  $V_{TOT}$ . On the other hand, 2-phenoxyethanol showed in matrinxã clear cardio respiratory signs of hypoxia immediately after the beginning of exposures. We observed bradycardia associated with arterial hypotension and decreased values of (%)  $V_{AMP}$  and  $V_{TOT}$  by the use of 2-phenoxyethanol.

**Key words:** matrinxã, *Brycon cephalus*, anesthetics, cardio respiratory responses.

## 1. Introdução

A anestesia em peixes é uma prática muitas vezes necessária para se manusear os animais, pois a movimentação excessiva dos mesmos predispõe os operadores a riscos de acidentes ao redor de equipamentos e materiais cirúrgicos como seringas e bisturis, além da possibilidade de que os próprios peixes se machuquem em consequência de impactos em superfícies duras por queda ou impulsão acidental (Inoue *et al.*, 2003).

Diversos são os anestésicos descritos para uso em peixes, sendo a escolha feita de acordo com a disponibilidade dos produtos nos mercados locais, preço e mínima chance de intoxicação (Iwama & Ackerman, 1994). O eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol são os anestésicos mais empregados no Brasil (Roubach & Gomes, 2001), onde, entretanto, não há legislação regendo as políticas de uso de produtos químicos na aquicultura, sendo geralmente as escolhas dos anestésicos feitas somente pelos de menores preços.

O eugenol é bastante divulgado como um anestésico alternativo para peixes, pois é um produto natural sem riscos aparentes de intoxicação para o homem e para os peixes. O eugenol é bastante empregado na odontologia, indústrias de alimentos e farmacêutica, com boa disponibilidade no mercado na forma pura de eugenol ou como óleo de cravo (Inoue *et al.*, 2003). Já a benzocaína apresenta boa disponibilidade a baixo custo. Esse anestésico apresenta vasto uso na composição de pomadas para uso humano com bons resultados também para a anestesia de peixes (Gomes *et al.*, 2001). O fenoxietanol é um anestésico muito utilizado no país com bons resultados como

anestésico para peixes, apesar de seu custo elevado e disponibilidade reduzida no mercado nacional (Inoue *et al.*, 2004).

Peixes expostos a banhos anestésicos apresentam claras mudanças nos parâmetros cardiorrespiratórios. Diversos autores classificam, em condições de campo, os estágios de anestesia em peixes de acordo com os graus de perda de equilíbrio e alterações nos batimentos operculares (Tabela 1). Porém, poucos são os trabalhos mensurando tais parâmetros (Randal, 1962; Randal & Smith, 1967 citado em Ross & Ross, 1999). Além do mais, para os peixes nativos da América do Sul não há nenhum trabalho reportando as alterações cardiorrespiratórias dos peixes submetidos a diferentes anestésicos.

O objetivo do presente trabalho foi descrever as respostas cardiorrespiratórias de matrinxã exposto aos diferentes anestésicos; eugenol, benzocaína e fenoxietanol em condições similares às encontradas no campo, onde se praticam curtas exposições de peixes a anestésicos para manipulações diversas como biometria, aplicação de injeções etc.

## **2. Material e métodos**

Peixes de mesma idade foram obtidos em uma estação comercial de produção de alevinos (Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP) e estocados nas instalações do Laboratório de Bioquímica Adaptativa por 6 meses. O suprimento de água nos tanques ocorreu através de sistema fechado de recirculação de água, mantendo-se monitorados os parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (30% PB) até a saciedade. Três grupos de 10 animais foram

respectivamente utilizados nos ensaios dos anestésicos eugenol ( $76.4 \pm 5.5$  g,  $17.7 \pm 0.4$  cm), benzocaína ( $74.6 \pm 5.8$  g,  $17.7 \pm 0.3$  cm) e fenoxietanol ( $63.5 \pm 2.8$  g,  $16.9 \pm 0.3$  cm).

### Procedimento cirúrgico

Foram realizados no Laboratório de Zoofisiologia Comparada (DCF-UFSCar), primeiramente anestesiando-se individualmente cada peixe e transferindo-o para a mesa cirúrgica, onde um fluxo contínuo de solução anestésica era fornecido para banhar diretamente as brânquias durante os procedimentos descritos:

1) Primeiramente, foi realizada uma incisão aproximadamente a 4 mm abaixo da linha lateral na região caudal para introdução de uma cânula (PE 50) na artéria caudal (Sundin *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 2000), seguida de sutura para fixação.

2) Uma segunda cânula (PE 60) foi implantada na cavidade bucal dos peixes através de uma perfuração na região dorsal do palato (Sundin *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 2000).

Cada cirurgia durou aproximadamente 10 min, sendo os peixes canulados individualmente transferidos para tubos de contenção, alocados em câmaras individuais de 16 litros de volume de água, dotados de fluxo contínuo de água aerada (2 L/min) a 25 °C. Realizou-se a recuperação cirúrgica dos peixes por 24 h antes do início dos protocolos experimentais.

### Protocolo experimental

O protocolo experimental seguiu-se individualmente para cada peixe que teve a cânula da artéria caudal conectada a um transdutor de pressão de um amplificador conectado a um sistema de aquisição de dados (DI 154 Dataq Instruments) para medição dos batimentos cardíacos (FH – beats/min) e pressão arterial (PA - %). Já a cânula implantada na cavidade bucal foi conectada a um transdutor de pressão de um amplificador conectado a um segundo canal do mesmo sistema de aquisição de dados, afim de que se medisse a frequência respiratória (FR – breaths/min) e a amplitude respiratória (Vamp - %).

Assim, 30 min após a montagem dos aparatos de aquisição de dados foi iniciado o ensaio de cada anestésico, sendo o primeiro grupo de 10 peixes expostos ao eugenol na concentração de 25 mg/L, o segundo grupo de peixes submetido à anestesia com a benzocaína na dose de 50 mg/L, e o terceiro e último grupo de 10 peixes anestesiados com o fenoxietanol em 300 mg/L. As dosagens dos citados anestésicos foram escolhidas a partir do capítulo anterior, que as caracterizou como suficiente para anestésiar o matrinxã (em estado de perda total de equilíbrio e incapacidade de restabelecimento da posição normal de nado) em torno de 2 min.

Assim, cada peixe foi exposto ao respectivo anestésico, primeiramente interrompendo-se o fluxo de água na câmara, que lotava cada peixe no tubo de contenção, e adicionando-se a respectiva dose do anestésico à água. Cinco minutos após a adição dos anestésicos o fluxo de água foi restabelecido na mesma vazão inicial (2 L/min), fazendo com que o anestésico fosse totalmente eliminado da câmara em 8 min. A observação da recuperação dos parâmetros

cardiorrespiratórios do matrinxã submetido à anestesia foi conduzida até 1 h após as exposições aos anestésicos.

### Registros e métodos estatísticos

As variáveis cardiovasculares e respiratórias foram monitoradas antes da exposição aos anestésicos, caracterizando os grupos controle que tiveram como registro os valores do instante 1 min. O período de exposição foi registrado como 1, 2, 3, 4 e 5 min. O período de recuperação foi caracterizado como 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, quando todos os peixes já apresentavam seus parâmetros cardiorrespiratórios devidamente recuperados.

As medidas de frequência cardíaca e frequência respiratória foram respectivamente expressas em valores absolutos de fH–batimentos/min e FR – respirações/min. Os valores de pressão arterial (PA) e amplitude de ventilação (V amp) foram expressos em unidades arbitrárias, ao passo que a ventilação total ( $V_{tot} = V_{amp} \times FR$ ) foi expressa como porcentagem das variações em relação ao grupo controle.

Os resultados do presente estudo estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Utilizou-se o software Graphpad Instat para o tratamento estatístico dos dados, que foram comparados às condições iniciais dos peixes (grupo controle) através dos testes de Dunnett e Student-Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ .

### **3. Resultados**

### Respostas respiratórias

Embora os três anestésicos testados tenham apresentado uma pequena diminuição dos valores de frequência respiratória nos primeiros instantes de anestesia (2 min), uma hiperventilação foi observada no matrinxã por ação do eugenol, da benzocaína e do fenoxietanol (Figura 1).

A diminuição dos valores de amplitude de ventilação foi marcante já no segundo min de anestesia (Figura 2). O eugenol apresentou aparentemente resposta mais aguda e duradoura que o fenoxietanol. A benzocaína induziu também uma aguda diminuição nos valores de amplitude de ventilação do matrinxã.

A ventilação total apresentou-se visivelmente diminuída por ação dos anestésicos eugenol, benzocaína e o fenoxietanol (Figura 3). A recuperação dos parâmetros respiratórios deu-se mais rapidamente que os parâmetros cardiovasculares.

### Respostas cardiovasculares

Na Figura 4 pode-se observar que os animais responderam ao eugenol e à benzocaína com um aumento dos valores de frequência cardíaca (taquicardia). O eugenol induziu uma taquicardia mais acentuada que a provocada pela benzocaína, e antes do retorno dos parâmetros pré-anestesia foi observada uma bradicardia rápida e não significativa. Observou-se também que o matrinxã anestesiado com a benzocaína apresentou uma resposta mais rápida em relação

aos valores pré-anestesia, sendo o restabelecimento dos mesmos mais rápidos em relação ao eugenol e o fenoxietanol.

A exposição ao fenoxietanol causou uma resposta inversa nos parâmetros cardiovasculares com uma marcante diminuição dos valores de frequência cardíaca (bradicardia) com resposta mais tardia desses valores, porém com duração mais prolongada.

Os três anestésicos induziram uma diminuição nos valores de pressão arterial (hipotensão), melhor visualizada no 2º minuto de exposição (Figura 5). O eugenol teve uma resposta mais acentuada e mais duradoura em relação a benzocaína e o fenoxietanol. A benzocaína induziu uma hipotensão seguida de hipertensão não significativa. Já o fenoxietanol induziu uma hipotensão rápida e os parâmetros normais foram retomados dentro do intervalo de 5 min (período de recuperação).

#### **4. Discussão**

A anestesia em peixes é conhecida por ser desencadeada através de depressão do sistema nervoso central (SNC) (Iwama & Ackerman, 1994). O eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol foram bastante efetivos na depressão do SNC do matrinxã, que teve também visíveis alterações dos parâmetros cardiorrespiratórios. As respostas detectadas no matrinxã parecem estar primeiramente relacionadas à percepção dos anestésicos na água através das brânquias, pois em todos os casos apresentaram aumentos visíveis dos valores de frequência respiratória, conjugados a diminuições da  $V_{TOT}$  % e  $V_{AMP}$  %. Os anestésicos conhecidamente interferem nas funções olfativas de peixes (Lewis *et*

*al.*, 1985) e, de acordo com os resultados do presente estudo, esses parecem também dificultar a atividade respiratória em matrinxã.

Ao perceber os anestésicos na água os animais tentavam escapar das condições adversas através do aumento nos batimentos operculares. Entretanto, a impossibilidade de fuga dos animais e o aumento da frequência respiratória aumentaram o contato com os anestésicos. Assim, a ação inibitória dos três anestésicos sobre a respiração do matrinxã foi evidenciada através das diminuições dos parâmetros respiratórios  $V_{AMP}$  % e  $V_{TOT}$  %.

Muitos estudos de cunho inteiramente prático classificam a anestesia em peixes de acordo com os graus de perda de equilíbrio na coluna de água e as alterações nos batimentos operculares (Woody *et al.*, 2002). Assim quatro estágios de anestesia são apresentados (Tabela 1), sendo que os estágios de 1 a 4 de anestesia fazem referência às visíveis diminuições dos movimentos operculares. Entretanto, de acordo com os resultados do presente trabalho, uma visível diminuição dos movimentos operculares não significa uma real diminuição nos esforços respiratórios dos peixes como foi observado nos valores aumentados de frequência respiratória. Dessa forma, a visualização de alterações nos batimentos operculares em condições de campo (Barreto & Volpato, 2004) pode não evidenciar uma real diminuição da frequência respiratória, embora os peixes pareçam não ter reação a qualquer estímulo externo - estágio 4 de anestesia (Woody *et al.*, 2002).

A capacidade de equilíbrio dos peixes na coluna de água nos banhos anestésicos é um aspecto de comportamento bastante notável. Observações meramente visuais e casuais registraram que nos primeiros segundos de

exposição dos peixes aos anestésicos, o matrinxã executou visível e amplos movimentos dos opérculos associados à intensa movimentação muscular na tentativa de manter o equilíbrio na coluna de água. Logo, a hiper-movimentação dos peixes é classicamente descrita como forte agente de aumento dos parâmetros respiratórios e cardíacos (Laurent *et al.*, 1983).

O eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol induziram a completa perda de equilíbrio no matrinxã associado ao aumento nos valores de frequência respiratória. Foi observada também taquicardia, quando o matrinxã exposto ao eugenol e a benzocaína, provavelmente como consequência da intensa atividade muscular experimentada pelos peixes já nos primeiros instantes das exposições aos anestésicos. De maneira semelhante, Randal & Smith (1967), citado em Ross & Ross (1999), verificaram que a tricaína metano sulfonato (MS 222) provocou um aumento nos valores de frequência cardíaca e respiratória em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) nos primeiros minutos de longas exposições a esse anestésico. Randal (1962) verificou que o MS 222 induziu a um aumento nos valores de frequência cardíaca de tenca (*Thinca thinca*) provavelmente devido a ação do MS 222 sobre a frequência cardíaca via sistema nervoso parassimpático. Em outro experimento, Randal (1962) confirmou tal hipótese, pois o MS 222 em contato direto com o coração isolado da tenca, da truta e da carpa induziu uma diminuição da frequência cardíaca. Tal observação foi reforçada, quando tencas com o nervo vago (X) bilateralmente cortado apresentaram diminuição dos valores de frequência cardíaca em exposição ao MS 222.

Nos trabalhos de Randal (1962) e Randal & Smith (1967), foi observado ainda que, conforme os peixes ficavam mais tempo expostos ao MS 222, os

valores de frequência cardíaca e respiratória diminuíam drasticamente após ter atingido os máximos valores desses parâmetros, iniciando os claros sinais cardiorrespiratórios de hipóxia. Segundo Hochachka (1980) e Baldisserotto (2002), os peixes estão sujeitos a variações na disponibilidade de oxigênio, que podem ocorrer por diminuição da pressão parcial de O<sub>2</sub> na água ou por problemas na captação de oxigênio através brânquias, os quais podem ter causas diversas como a presença de parasitos nas brânquias ou de compostos químicos na água, tais como os anestésicos (Hochachka, 1980; Pavanelli *et al.*, 1998; Sladky *et al.*, 2001). Assim, as adaptações cardiorrespiratórias em peixes são observadas em condições de hipóxia, sendo caracterizadas por aumento da ventilação branquial através de elevação da frequência respiratória, bem como bradicardia e aumento na força de contração do coração. Isso reduziria o débito cardíaco, pois a velocidade de passagem do sangue nas lamelas é reduzida, favorecendo o contato e a difusão do oxigênio da água para o sangue (Hochachka, 1980; Baldisserotto, 2002). Peixes tropicais (traíras) em condições hipóxicas apresentam bradicardia com aumentos significativos nos índices de ventilação (Rantin *et al.*, 1992; Rantin *et al.*, 1993).

O protocolo experimental do presente estudo foi executado de maneira a simular as condições de campo em que o matrinxã é mais comumente anestesiado para fins diversos em tempos curtos de exposição (em torno de 5 min). A bradicardia observada por ação do fenoxietanol no matrinxã muito provavelmente foi consequência da alta concentração necessária para que esse produto químico tenha o mesmo efeito do eugenol e da benzocaína, em induzir o

estágio 3 de anestesia (Woody *et al.*, 2002) no matrinxã em aproximadamente 2 min.

Assim, é possível que o matrinxã, quando exposto ao fenoxietanol, tenha encontrado condições mais adversas à respiração devido a uma maior saturação desse produto nas brânquias em relação ao eugenol ou a benzocaína já nos primeiros instantes de exposição, evidenciando uma bradicardia em consequência das condições de hipóxia. Por outro lado, o eugenol e a benzocaína não resultam em bradicardia como consequência da hipóxia, muito provavelmente devido ao curto período de exposição do matrinxã aos anestésicos e as concentrações mais baixas necessárias para atingir o estágio 3.

Os mecanismos de ação dos anestésicos em peixes não são ainda bem conhecidos (Ross & Ross, 1999). A generalização dos mesmos gira em torno do desencadeamento da depressão do sistema nervoso central através de inibições nos axônios, na liberação dos transmissores ou na excitabilidade das membranas nervosas. Assim, os peixes atingem os estágios de anestesia quando os anestésicos alcançam níveis específicos no cérebro e na medula espinhal através da circulação sanguínea (Riedesel, 1997).

A captação dos anestésicos dissolvidos na água pelos peixes acontece através das brânquias, difundindo-se para o sangue, que o conduz até o sistema nervoso central. Alguns fatores influenciam tal percurso, tais como a lipo-solubilidade e a solubilidade dos anestésicos no sangue. De forma geral, quanto maior a lipo-solubilidade de determinado anestésico, maior sua eficiência anestésica, pois mais rapidamente se difundirá do sangue para os centros nervosos. Por outro lado, quanto maior a solubilidade do anestésico no sangue,

menor sua eficiência, pois serão necessários maiores concentrações e tempos para que se sature o sangue com os anestésicos, que se difundirão mais vagarosamente para os centros nervosos (Riedesel, 1997).

O fenoxietanol é um anestésico de solubilidade mais baixa que o eugenol e a benzocaína (Roubach & Gomes, 2001), esclarecendo-se assim as concentrações mais altas necessárias, para que se atinjam os mesmos efeitos no matrinxã (vide resultados do capítulo 2). Especula-se que o eugenol seja um depressor na excitação de contração da musculatura esquelética, com antagonismo nos canais de cálcio, desequilibrando os potenciais de voltagem e receptores de cálcio (Lahlou *et al.*, 2004). Já a benzocaína tem ação direta nos canais de sódio, sendo sua atuação a de evitar a geração e condução de estímulos nervosos, pois barra a condução dos estímulos, diminuindo ou impossibilitando que se produza o incremento de transição da permeabilidade de sódio nas membranas excitáveis e causando ligeira despolarização (Otorrinoweb, 2004).

É notável que as respostas cardiorrespiratórias do matrinxã aos anestésicos estudados no presente capítulo estivessem provavelmente associadas a respostas fisiológicas de estresse, que, embora não mensuradas, pudemos notar. Porém, isso não invalida o uso do eugenol, da benzocaína e do fenoxietanol em condições de campo, pois esses anestésicos possibilitam a devida manipulação de juvenis de matrinxã, sem que sejam observadas as conseqüências desastrosas comumente presentes, quando se realizam práticas como biometria, injeções e marcações em peixes não anestesiados (Inoue *et al.*, 2003). De maneira semelhante para peixes de água fria, a anestesia proporciona estados de relativa

hipoxinemia, sendo assim admitido que os anestésicos confirmam condições de estresse mais baixas durante o manuseio dos peixes (Iwama & Ackerman, 1994).

## **5. Conclusão**

A administração de anestésicos para o matrinxã deve ocorrer em função da sua concentração dos produtos químicos na água e do tempo de exposição, pois através das funções cardíacas e respiratórias os anestésicos chegam até o cérebro e medula espinhal, onde atuam deprimindo o sistema nervoso central. O estado de anestesia é então desencadeado nos determinados intervalos de tempo. O eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol propiciam imobilização apropriada do matrinxã com distúrbio médio dos parâmetros cardiorrespiratórios, já que os peixes se apresentaram recuperados 30 min após os banhos anestésicos. Entretanto para o uso do fenoxietanol em matrinxã, foi necessária uma concentração bem mais alta que o eugenol e a benzocaína para produzir o mesmo efeito anestésico, além de evidenciar claramente estado de hipóxia já nos primeiros instantes de exposição.

Tabela1. Características comportamentais dos peixes de acordo com os diferentes estágios de anestesia.

Estágio	Característica de comportamento
1	Desbalanço visível dos movimentos operculares
2	Perda parcial de equilíbrio e dificuldade em manter posição normal de nado, quando parado.
3	Perda total de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição vertical de nado (“barriga para cima”)
4	Ausência de reação a qualquer estímulo
Recuperado	Recuperação da posição normal de nado e da capacidade de nadar.

Fonte: Woody *et al.* (2002).

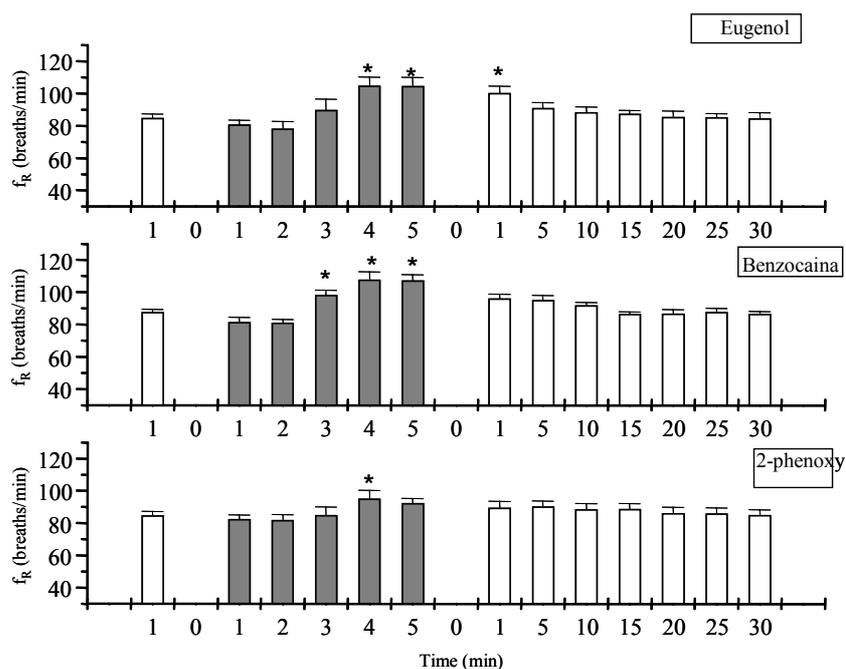


Figura 1. Efeito dos anestésicos eugenol, benzocaína e fenoxietanol nos valores de freqüência respiratória ( $F_R$  – breaths/min) do matrinxã. O protocolo experimental (barras em cinza) foi em dose necessária para se anestésiar os peixes em 2 min (eugenol 25 mg/L, benzocaína 50 mg/L e fenoxietanol 300 mg/L). Registros foram também feitos durante período de recuperação (barras em branco).

\* indica diferença em relação aos valores pré-anestesia.

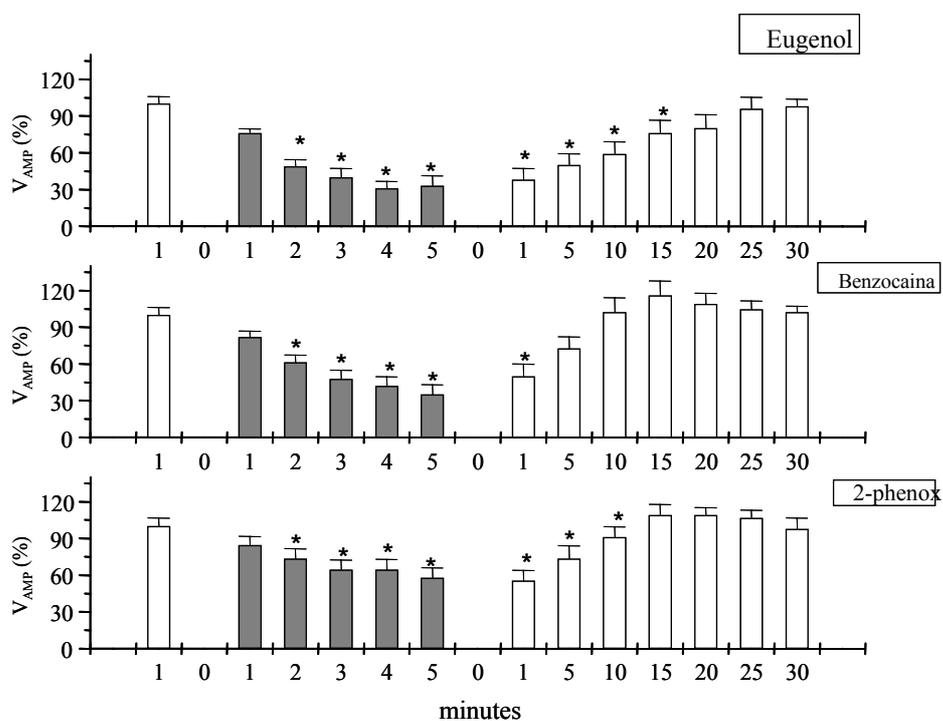


Figura 2. Efeito dos anestésicos eugenol, benzocaína e fenoxietanol nos valores de amplitude de ventilação ( $V_{AMP}$  %) do matrinxã. O protocolo experimental (barras em cinza) foi em dose necessária para se anestésiar os peixes em 2 min (eugenol 25 mg/L, benzocaína 50 mg/L e fenoxietanol 300 mg/L). Registros foram também feitos durante período de recuperação (barras em branco).

\* indica diferença em relação aos valores pré-anestesia.

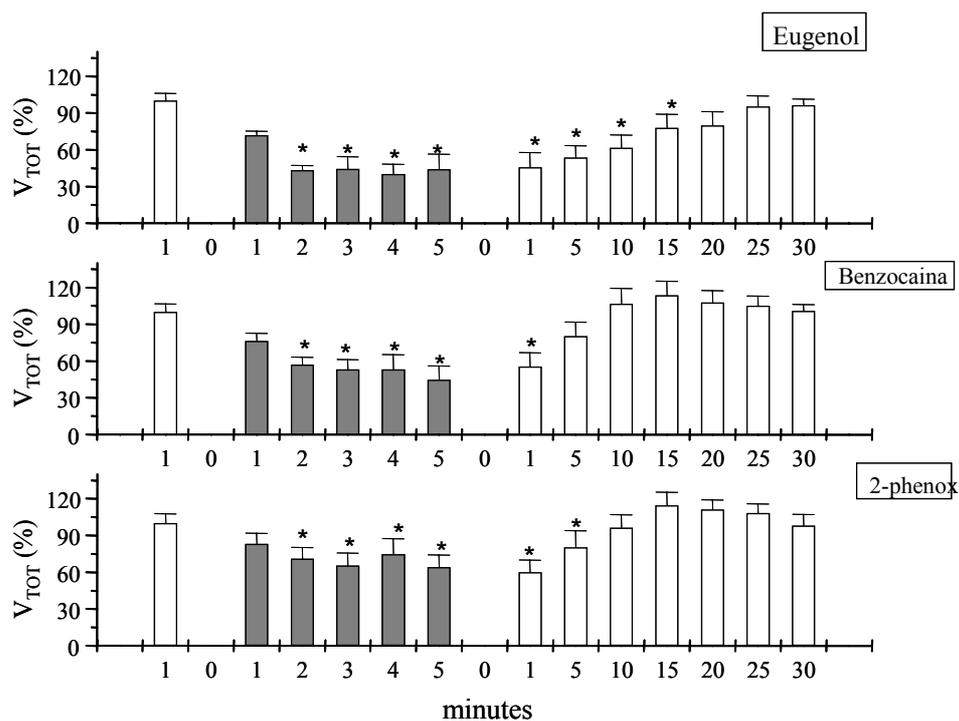


Figura 3. Efeito dos anestésicos eugenol, benzocaína e fenoxietanol nos valores de ventilação total ( $V_{tot}$  - %) do matrinxã. O protocolo experimental (barras em cinza) foi em dose necessária para se anestésiar os peixes em 2 min (eugenol 25 mg/L, benzocaína 50 mg/L e fenoxietanol 300 mg/L). Registros foram também feitos durante período de recuperação (barras em branco).

\* indica diferença em relação aos valores pré-anestesia.

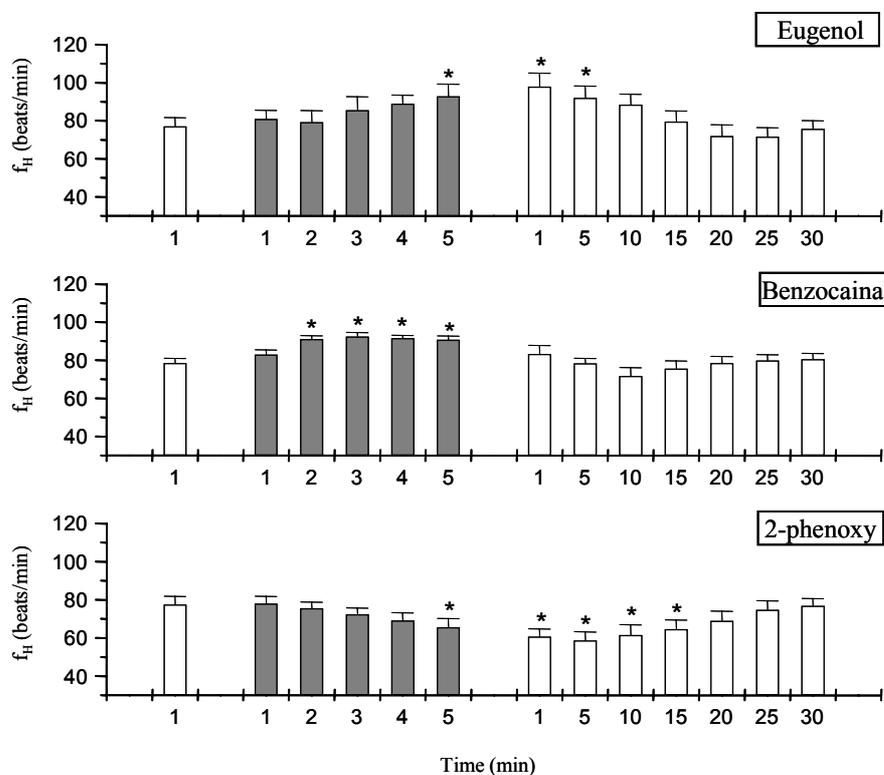


Figura 4. Efeito dos anestésicos eugenol, benzocaína e fenoxietanol nos valores de frequência cardíaca ( $f_H$  – beats/min) do matrinxã. O protocolo experimental (barras em cinza) foi em dose necessária para se anestésiar os peixes em 2 min (eugenol 25 mg/L, benzocaína 50 mg/L e fenoxietanol 300 mg/L). Registros foram também feitos durante período de recuperação (barras em branco).

\* indica diferença em relação aos valores pré-anestesia.

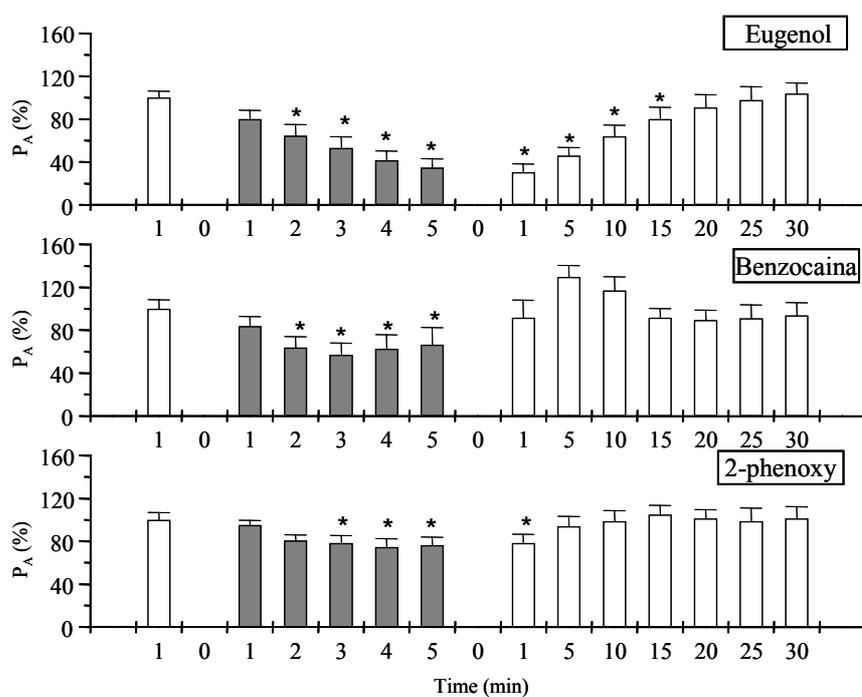


Figura 5. Efeito dos anestésicos eugenol, benzocaína e fenoxietanol nos valores de pressão arterial (Pa - %) do matrinxã. O protocolo experimental (barras em cinza) foi em dose necessária para se anestésiar os peixes em 2 min (eugenol 25 mg/L, benzocaína 50 mg/L e fenoxietanol 300 mg/L). Registros foram também feitos durante período de recuperação (barras em branco).

\* indica diferença em relação aos valores pré-anestesia.

## 6. Referências bibliográficas

- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Editora UFSM, Santa Maria, 2002, 211 p.
- BARRETO, R.E., VOLPATO, G. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. **Behavioural Process**, v. 66, p. 43-51, 2004.
- GOMES, L., CHIPPARI GOMES, A., LOPES, N., ROUBACH, R., ARAUJO-LIMA, C. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **J. World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001.
- HOCHACHKA, P.W. **Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance**. Harvard University press, Cambridge, 1980. 181 p.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 563-565, 2004.
- LAHLOU, S., INTERAMINENSE, F., MAGALHÃES, P., LEAL-CARDOSO, J.H., DUARTE, G. Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 43, n. 2, p. 250-257, 2004.

- LAURENT, P., HOLMGREEN, S., NILSSON, S. 1983. Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76A, n. 3, p. 525-542, 1983.
- LEWIS, D.H., TARPLEY, D.J., MARKS, J.E., *et al.*. Drugs induced structural changes in olfactory organ of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of Fish Biology**. v. 26, p. 355-358, 1985.
- OTORRINOWEB. Benzocaína. Capturado em 23 de Agosto de 2004. **Disponível na internet** [www.otorrinoweb.com](http://www.otorrinoweb.com)
- PAVANELLI, G.C., EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M. 1998. **Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Eduem, Maringá, 1998. 264 p.
- RANDAL, D. Effect of an anesthetic on the heart and respiration of teleost fish. **Nature**, v. 195, p. 506, 1962.
- RANTIN, F.T., KALININ, A.L., GLASS, M.L., FERNANDES, M.N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **Journal of Fish Biology**, v. 141, p. 805-812, 1992.
- RANTIN, F.T., GLASS, M.L., KALININ, A.L., VERZOLA, R.M.M., FERNANDES, M.N. Cardio respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environmental Biology of Fish**, v. 36, p. 93-97, 1993.
- REID, S.G., SUNDIN, L., KALININ, A.L., RANTIN, F.T., MILSON, W.K. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traira (*Hoplias*

- malabaricus*): CO<sub>2</sub>/pH chemoresponses. **Respiratory Physiology**, v. 120, p. 47-59, 2000.
- RIEDESEL, D. Anestésicos. In: Ahrens, F. (Ed.). **Farmacologia Veterinária**. Editora Artes Médicas, Porto Alegre, p. 107-135, 1997.
- ROUBACH, R., GOMES, L. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.
- ROSS, L., ROSS, B. **Anesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. London: Blackwell Science, 1999. 157 p.
- SUNDIN, L., REID, S.G., KALININ, A.L., RANTIN, F.T., MILSOM, W.K. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traira (*Hoplias malabaricus*) O<sub>2</sub> chemoresponses. **Respiratory Physiology**, v. 116, p. 181-199, 1999.
- SLADY, K., CLIFFORD, R., SWANSON, D.V.M. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anaesthetic in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.
- WOODY, C.A., NELSON, J., RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 340-347. 2002.

## CAPÍTULO 4

### **Avaliação da eficiência anestésica do eugenol, benzocaína e fenoxietanol para o manuseio de juvenis de matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): respostas hematológicas e plasmáticas**

**Resumo** - O matrinxã *Brycon cephalus* vem ganhando espaço na piscicultura nacional como valiosa mercadoria nos estabelecimentos de pesque-pague, além de apresentar características zootécnicas desejáveis de crescimento e conversão alimentar. Entretanto, o matrinxã, devido à sua movimentação excessiva durante o manuseio, pode sofrer injúrias sérias, propiciando a manifestação de patógenos e/ou posterior morte. O eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol vêm sendo amplamente empregados no Brasil com bons resultados na imobilização desse peixe, porém, o uso adequado desses anestésicos requer esclarecimentos de ordem técnica para manipulação. Dessa forma, o presente trabalho visou descrever algumas respostas fisiológicas do matrinxã ao eugenol, à benzocaína e ao fenoxietanol. Juvenis foram submetidos a banhos anestésicos para a indução de anestesia leve e anestesia profunda, sendo examinados os valores sanguíneos de hematócrito, bem como as concentrações plasmáticas de glicose, lactato, amônia total, íons (sódio, cloreto, potássio) e proteína. Nossos resultados indicam boas perspectivas no uso desses anestésicos na indução de anestesia leve. Para a indução de anestesia profunda a benzocaína apresentou-se mais satisfatória.

**Palavras-chaves:** matrinxã, *Brycon cephalus*, anestésicos, respostas, plasma.

**Abstract** - ASSESSMENT OF THE ANESTHETICS EUGENOL, BENZOCAINE, AND 2-PHENOXYETHANOL FOR FIELD PROCEDURES IN MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*). Matrinxã is a characidae species from Brazil that has been reared in our fish farms with excellent growth and feed conversion ratios. Furthermore, matrinxã has good characteristics for sport fishing industry that requires aggressive and fierce fish that attack fishing baits properly. However, matrinxã management has been complicated by the movements that fish does during handling and other field procedures as biometry, tags and surgeries. Eugenol, benzocaine, and 2-phenoxyethanol have been indicated in matrinxã handling, but little information is available about matrinxã responses to such anesthetics. The present work evaluated some physiological responses of matrinxã exposed to eugenol, benzocaine, and 2-phenoxyethanol through the values of blood hematocrit, and plasma values of glucose, lactate, total ammonia, ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ) and protein. Eugenol, benzocaine and 2-phenoxyethanol were suitable to induce anesthesia in matrinxã, but only benzocaine could be indicated to induce deep anesthesia.

**Key words:** matrinxã, *Brycon cephalus*, anesthetics, responses, plasma.

## 1. Introdução

O matrinxã é um peixe originário da Bacia Amazônica, de extrema importância no país devido ao grande valor econômico e social em sua região de origem, bem como produto nos estabelecimentos de pesca esportiva, localizados nas diferentes regiões do país (Carneiro & Urbinati, 2001). Entretanto, o matrinxã é um peixe extremamente agitado e voraz, sendo sua manipulação bastante

complicada, pois sua movimentação excessiva pode resultar em ferimentos nos animais durante as diferentes práticas de campo, como a biometria e a transferência entre tanques. É comum o relato de significativa perda de escamas, propiciando a manifestação de doenças e/ou posterior morte.

O uso de anestésicos para se manusear juvenis de matrinxã tem sido assunto bastante interessante entre os profissionais das áreas de aquicultura e biologia de peixes, que sempre buscam novas alternativas e esclarecimentos, no que tangem às restrições ao uso, à segurança aos operadores e aos efeitos colaterais dos anestésicos (Carneiro & Urbinati, 2001; Roubach & Gomes, 2001). Nesse sentido, a utilização do eugenol, da benzocaína e do fenoxietanol apresenta grande potencial para se manusear peixes vivos, pois o primeiro apresenta boas propriedades anestésicas para peixes, além de vasto uso na odontologia, seguido da benzocaína, que tem baixo custo. Já o fenoxietanol tem propriedades anti-sépticas com risco relativamente baixo de intoxicações (Roubach & Gomes, 2001; Gomes *et al.*, 2001).

Segundo diversos autores (Iwama & Ackerman, 1994; Hattingh, 1976), os efeitos das práticas de campo podem ser avaliados através de diversos parâmetros metabólicos e iônicos. Assim os valores plasmáticos de glicose, lactato, amônia e íons (sódio, potássio e cloreto) são boas ferramentas na avaliação da intensidade da manipulação de peixes em diversos locais.

O presente trabalho avaliou o uso do eugenol, da benzocaína e do fenoxietanol para se manipular juvenis de matrinxã, quantificando-se algumas de suas principais respostas fisiológicas à anestesia leve e profunda. Esse trabalho

teve ainda o propósito de contribuir para o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo do matrinxã rotineiramente realizadas em condições de campo e de laboratório.

## **2. Material e métodos**

Foram realizados três experimentos distintos. Em cada experimento, a estocagem e a aclimação dos peixes foram realizadas em 4 caixas com capacidade de 200 litros de água, em sistema de circulação fechada nas instalações do Laboratório de Bioquímica Adaptativa da Universidade Federal de São Carlos. A aclimação dos peixes foi efetuada ao longo de 15 dias, sendo monitorada a qualidade da água (temperatura  $25,7 \pm 0,9$  °C, oxigênio dissolvido  $5,66 \pm 0,07$ , condutividade  $74,3 \pm 4,8$   $\mu\text{S.cm}$  e pH 7,0). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade.

As doses de eugenol, benzocaína e fenoxietanol, utilizadas no presente estudo, foram anteriormente avaliadas no Capítulo 2, constatando-se o fenômeno dose-efeito dos três anestésicos no tempo de indução à anestesia em relação a doses crescentes. Os procedimentos experimentais foram conduzidos como se segue:

- Controle – os peixes foram somente amostrados.
- T1 – antes da amostragem, os peixes foram retirados das caixas de origem, colocados em aquários de 30 L por 10 min e retornados para as caixas de origem por mais 10 min.

- T2 – antes da amostragem, os peixes receberam o mesmo manejo de T1, sendo, entretanto, adicionados aos aquários de 30 L os anestésicos eugenol (1º experimento – 15 mg/L), benzocaína (2º experimento – 20 mg/L) e fenoxietanol (3º experimento – 250 mg/L), a fim de se obter anestesia leve do matrinxã, que é caracterizado como o estágio 3 de anestesia (perda total de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição normal de nado, Tabela 2).
- T3 – antes da amostragem, os peixes receberam o mesmo manejo conduzido em T1, sendo, entretanto, adicionados nos aquários de 30 L os anestésicos eugenol (1º experimento – 60 mg/L), benzocaína (2º experimento – 60 mg/L) e fenoxietanol (3º experimento – 600 mg/L), a fim de se obter anestesia profunda do matrinxã, que é caracterizada pelo estágio 4 de anestesia (ausência de reação a qualquer estímulo externo, Tabela 2).

Cada grupo continha 10 peixes ( $46,1 \pm 6,2$  g e  $15,3 \pm 0,8$  cm), sendo todos coletados imediatamente após aos procedimentos experimentais acima descritos (Controle, T1, T2 e T3). Coletou-se assim o sangue de todos os peixes através de seringas previamente heparinizadas via artéria caudal. Túbulos foram preenchidos e vedados em uma das extremidades para centrifugação a  $12.000 \times g$  por 3 min para determinação dos valores de micro-hematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971). Alíquotas de sangue foram também centrifugadas para obtenção de plasma para os ensaios de glicose (Dubois, 1956), lactato (Harrower & Brown, 1972), amônia

total (Gentzkow & Masen, 1942), proteína (Lowry *et al.*, 1951), e cloreto (APHA, 1980) através de métodos colorimétricos. Os valores plasmáticos de íons sódio (Na) e potássio (K) foram determinados por fotometria de chama.

As análises estatísticas foram realizadas para cada experimento através do método não paramétrico de Kruskal-Wallis, com significância de  $P < 0.05$ , seguido de teste de médias de Dunn ( $P < 0.05$ ).

Os parâmetros físico-químicos de qualidade de água foram também monitorados (pH 6,8, temperatura  $25,7 \pm 0,9$  °C, oxigênio dissolvido  $5,66 \pm 0,07$  mg/l, e condutividade  $74,3 \pm 4,8$   $\mu\text{S.cm}$ ), permanecendo assim dentro das condições ideais para o cultivo de organismos aquáticos (Arana, 1997).

### 3. Resultados

Não foi observada mortalidade de peixes no desenvolvimento dos 3 experimentos. O matrinxã apresentou valores de hematócrito significativamente mais elevados, quando submetido à anestesia profunda através do eugenol, da benzocaína e do fenoxietanol (Figura 1). Os valores de glicose plasmática foram significativamente mais elevados na presença do eugenol e fenoxietanol para anestesia profunda em T3 (Figura 2).

Os três diferentes anestésicos propiciaram valores de lactato plasmático significativamente mais elevados em T1. Entretanto, o fenoxietanol provocou menor produção de lactato em T2 e T3, enquanto o eugenol e a benzocaína induziram discretamente uma diminuição da produção de lactato em T3 (Figura 2).

Os valores de amônia plasmática indicaram certo grau de distúrbio na excreção nitrogenada do matrinxã durante os procedimentos experimentais, mostrando-se que o fenoxietanol foi mais severo na indução de anestesia profunda seguida pelo eugenol (Figura 2).

As respostas iônicas foram distintas para os três anestésicos (Tabela 1). O balanço eletrolítico do matrinxã apresentou-se constante no que se refere ao sódio plasmático. O eugenol e o fenoxietanol induziram significativa diminuição dos valores de potássio plasmático em T3. Ainda o fenoxietanol levou a um decréscimo na concentração de cloreto em T2 e de potássio em T3, bem como a um aumento da proteína plasmática em T3. A benzocaína apresentou menores perdas de íons cloreto em T3.

#### **4. Discussão**

Os três anestésicos, eugenol, benzocaína e o fenoxietanol, vêm sendo bastante empregados no Brasil com bons resultados na imobilização de peixes, garantindo condições seguras para manipulação de peixes durante a biometria, injeções, marcação, cirurgias e outras operações, rotineiramente realizadas nas unidades de piscicultura e pesquisas.

Os estágios de anestesia de peixes descritos na literatura sempre levam em consideração as alterações na frequência dos batimentos operculares e da capacidade de equilíbrio do animal na coluna de água (Tabela 2). Assim, o matrinxã em T2 esteve em estágio 3 de anestesia, caracterizado por apresentar alguma perda dos batimentos operculares com perda total de equilíbrio. Já os peixes de T3 estiveram em estágio 4 de anestesia, apresentando perda total de

equilíbrio e batimentos operculares, não respondendo a qualquer estímulo externo.

Foi possível observar através dos aumentos nos valores de hematócrito que o eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol provavelmente induziram uma contração esplênica no matrinxã no estado de anestesia profunda. O aumento dos valores de hematócrito em T3 (anestesia profunda) pode ter sido causado também pelo aumento do volume das hemáceas da espécie em questão. Tort *et al.* (2002) observaram que “seabream” e *Oncorhynchus mykiss* apresentam alterações claras de parâmetros hematológicos (principalmente hematócrito) e plasmáticos de cortisol, quando esses peixes são submetidos ao fenoxietanol e o óleo de cravo. Outros estudos de Carneiro & Urbinati (2001), Urbinati & Carneiro (2001) indicam que o matrinxã não tem aumento significativo dos valores de hematócrito em baixas concentrações de benzocaína (20 mg/L).

O aumento da glicose plasmática é conhecido como um bom indicador de estresse em peixes em condições de campo (Hattingh, 1976), similares àquelas a que o matrinxã foi submetido no presente estudo. Os peixes em situação de estresse geralmente fazem uso de suas reservas hepáticas de glicogênio através de glicogenólise, disponibilizando maior quantidade de energia para o organismo fugir ou se adaptar às novas condições ambientais (Iwama *et al.*, 1989; Iwama *et al.*, 2004). Esta alteração metabólica foi evidenciada nos peixes submetidos à anestesia profunda através do eugenol e do fenoxietanol, os quais apresentam valores de glicose plasmática aumentados. Logo, a anestesia profunda através do eugenol e do fenoxietanol foi aparentemente mais severa ao matrinxã do que a mesma induzida pela benzocaína.

O eugenol não levou a um aumento do lactato plasmático, assim como o fenoxietanol, que diminuiu os valores de lactato plasmático em T2 e em T3, sugerindo que esses dois anestésicos foram eficientes na imobilização do matrinxã, não apresentando reação a qualquer estímulo. Ainda é sugerido que a respiração dos peixes não foi prejudicada de forma significativa por ação do eugenol e do fenoxietanol. Já a benzocaína induziu essa característica (ausência de aumento do lactato) somente em T2, enquanto que em T3, provocou um aumento nos valores de lactato plasmático, podendo indicar uma condição de prejuízo significativo à respiração do matrinxã (Iwama *et al.*, 1989).

Como peixes anestesiados sofrem reduções nas funções nervosas e respiratórias (Summerfelt & Smith, 1990), ocorreu uma sensível alteração dos batimentos operculares e do fluxo sangüíneo, dificultando a excreção nitrogenada e as trocas iônicas através de difusões nas brânquias. Isso pode explicar o aumento da amônia e da proteína plasmática em T3 sob ação do fenoxietanol, já que o peixe em anestesia profunda não consegue transportar adequadamente os metabólitos para os tecidos, nem retirar as excretas das células. As mesmas afirmações são válidas para as alterações iônicas do matrinxã observadas em T2 do fenoxietanol, pois os peixes não podem regular suas trocas iônicas com o meio de maneira apropriada (Sladky *et al.*, 2001). O eugenol, por outro lado, pareceu não alterar a excreção nitrogenada, pois o aumento observado nos valores de amônia plasmática somente ocorreu devido ao manejo para a condução dos banhos de anestesia leve e anestesia profunda.

O eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol trouxeram benefícios para a indução de anestesia leve no matrinxã, enquanto que somente a benzocaína

apresentou alterações fisiológicas brandas na indução de anestesia profunda em matrinxã. Assim, a benzocaína pareceu trazer menos efeitos colaterais na anestesia profunda do matrinxã, quando comparada aos outros anestésicos testados.

Tabela 1. Valores plasmáticos de sódio, cloreto, potássio e proteína do matrinxã exposto ao eugenol, benzocaína e 2-phenoxyethanol (média  $\pm$  se). Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup> estão expressos em mEq/L, e proteína em mg/ml. Grupos Controle – peixes somente amostrados, T1 peixes manuseados, T2 peixes manuseados em anestesia leve, T3 peixes manuseados em anestesia profunda.

Parâmetros plasmáticos				
<b>Eugenol</b>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Proteína
Controle	148,1 $\pm$ 7,6	119,1 $\pm$ 7,7	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,03
T1	145,6 $\pm$ 4,9	121,2 $\pm$ 4,6	2,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,02
T2	154,7 $\pm$ 3,3	135,5 $\pm$ 5,6	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,02
T3	151,0 $\pm$ 5,4	134,2 $\pm$ 3,8	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,36 $\pm$ 0,03
<b>Benzocaína</b>				
Controle	161,8 $\pm$ 4,0	95,2 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,3	0,83 $\pm$ 0,13
T1	171,0 $\pm$ 6,7	115,3 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,8	0,72 $\pm$ 0,10
T2	164,8 $\pm$ 4,1	110,6 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 0,1	0,63 $\pm$ 0,02
T3	165,2 $\pm$ 9,5	91,1 $\pm$ 3,0 <sup>ac</sup>	1,5 $\pm$ 0,1	0,73 $\pm$ 0,12
<b>Fenoxietanol</b>				
Controle	150,8 $\pm$ 3,4	121,0 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	4,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
T1	147,7 $\pm$ 2,7	108,9 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
T2	139,2 $\pm$ 4,2	103,1 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	4,3 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
T3	157,1 $\pm$ 3,8	117,7 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	2,7 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>	0,50 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>

Tabela 2. Características comportamentais dos peixes de acordo com os diferentes estágios de anestesia.

Estágio	Característica de comportamento
1	Desbalanço visível dos movimentos operculares
2	Perda parcial de equilíbrio e dificuldade em manter posição normal de nado, quando parado.
3	Perda total de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição vertical de nado (“barriga para cima”)
4	Ausência de reação a qualquer estímulo
Recuperado	Recuperação da posição normal de nado e da capacidade de nadar.

Fonte: Woody *et al.* (2002).

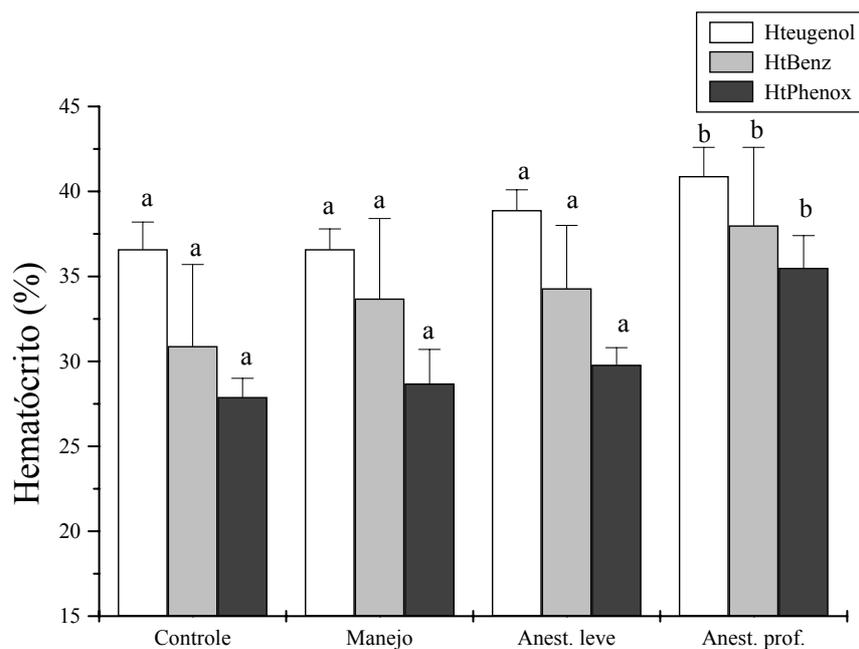


Figura 1. Valores de hematócrito (%) do matrinxã, quando submetido ao manejo e banhos anestésicos com eugenol, benzocaína e fenoxietanol.

Letras distintas indicam diferenças significativas entre as diferentes condições para cada anestésico.

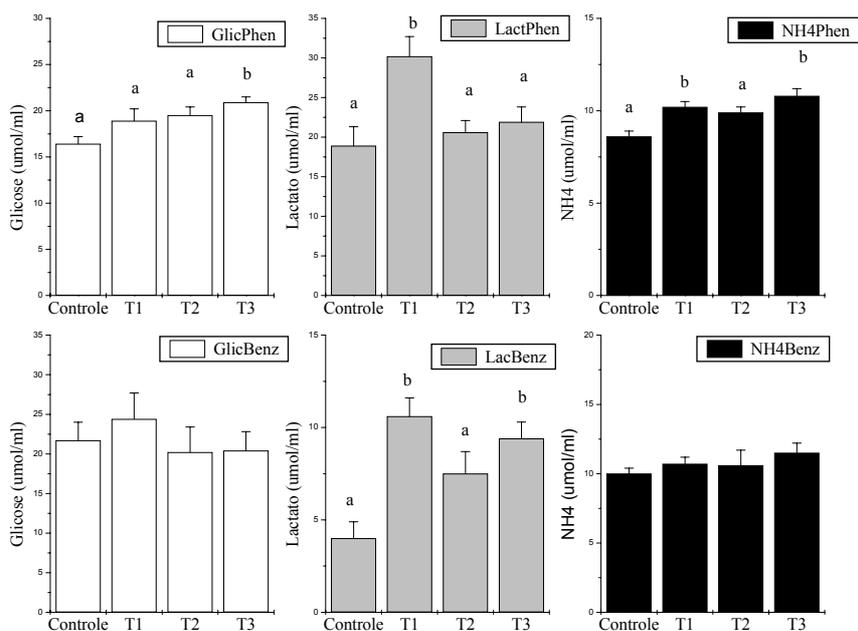


Figura 2. Valores plasmáticos (média  $\pm$  s.e.) de glicose, lactato e amônia no matrinxã submetido ao manejo de anestesia com eugenol, benzocaína e fenoxietanol. Controle – peixes somente amostrados, T1 - peixes submetidos somente ao manuseio, T2 – peixes manuseados para anestesia leve, T3 – peixes manuseados para anestesia profunda.

## 5. Referências bibliográficas

- APHA. **Standard methods for determinations of water and wastes**. 12 ed. Joint Editorial board, Washington, DC. 1980. 554 p.
- ARANA, L. **Princípios químicos e físicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Editora da UFSC, Florianópolis, 1997. 166 p.
- CARNEIRO, P., URBINATI, E. Plasma Electrolyte Disturbance in Matrinxã *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. **Journal of Applied Aquaculture**. v. 11, n. 4, p. 1-13, 2001.
- DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-358. 1956.
- GENTZKOW, C.J., MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 143, p. 531-544, 1942.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinic Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.
- GOMES, L., CHIPPARI-GOMES, A., LOPES, N., ROUBACH, R., ARAUJO-LIMA, C. Efficacy of benzocaine as an Anesthetic in Juvenile Tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001.

- HARROWER, J.R., BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, n. 5, p. 224-228, 1972.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. **Journal of Fish Biology**, v. 10, p. 191-195, 1976.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Benzocaína como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Boletim Técnico do Cepta**, v. 15, p. 23-30, 2002.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 563-565, 2004.
- IWAMA, G., MCGEER, J., PAWLUK, M. The effects of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 2065-2073, 1989.
- IWAMA, G., ACKERMAN, A. Anaesthetics In. HOCHACHKA, P.; MOMMSEN. **Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 3. Elsevier Science, Amsterdam, Cap. 1, p. 1-15, 1994.
- IWAMA, G., AFONSO, L., TODGHAM, A., ACKERMAN, P., NAKANO, K. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, 2004.
- LOWRY, D.H., ROSENBROUGH, N.J., FAR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

ROUBACH, R., GOMES, L. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes.

**Panorama da Aqüicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.

SLADKY, K., SWANSON, C., STOSKOPF, M., LOOMIS, M., LEWBART, G.

Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of**

**Veterinarian Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.

SUMMERFELT, R., SMITH, L. Anesthesia, surgery, and related techniques. in

**Methods for Fish Biology**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p. 213-272, 1990, 684 p.

TORT, L., PUIGSERVER, M., CRESPO, S., PADRÓS, F. Cortisol and

haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.

URBINATI, E., CARNEIRO, P. Metabolic and hormonal responses of matrinxã,

*Brycon cephalus*, (Teleost: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 16, n. 1, p. 75-85, 2001.

WOODY, C.A., NELSON, J., RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult

sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 340-347. 2002.

## CAPÍTULO 5

### Respostas fisiológicas e bioquímicas do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte

**Resumo** – O transporte de peixes vivos é um dos procedimentos mais realizados em condições de campo pela necessidade real de se remover os animais de um local a outro ao longo dos cultivos. Entretanto, essa prática de manejo é bastante severa para os peixes, evidenciando as diversas respostas do estresse, que são indicadas através dos aumentos dos valores plasmáticos de cortisol e glicose, bem como através do desbalanço eletrolítico do plasma. O presente trabalho visou quantificar as principais respostas ao estresse do matrinxã, quando submetido ao manuseio e transporte. Avaliamos também os efeitos do sal marinho (NaCl) e do óleo de cravo (Eugenol) no alívio das respostas ao estresse de transporte em sacos plásticos. Esses produtos têm sido propostos no transporte de peixes vivos, embora seja ainda necessário o esclarecimento dos benefícios reais que trariam bem como elucidações nos procedimentos de uso. Dessa forma, observamos em três experimentos que o óleo de cravo pôde atenuar as principais respostas ao estresse do matrinxã durante o transporte, enquanto o sal marinho pôde apenas atenuar algumas das respostas secundárias ao estresse. Esses produtos são então sugeridos no transporte do matrinxã em sacos plásticos como profiláticos na redução de algumas respostas de estresse. O custo energético alto para o matrinxã tolerar as práticas de transporte foi também evidenciado através das reduções visíveis dos valores de glicogênio hepático.

**Palavras chave:** matrinxã, *Brycon cephalus*, estresse, transporte, sal NaCl, óleo de cravo eugenol.

**Abstract** – PHYSIOLOGICAL STRESS RESPONSES IN MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*) SUBMITTED TO HAULING AND TRANSPORT. Although fish transport is necessary in all fish farms and fish biology facilities, many drastic consequences are usually observed as fish injuries and mortality. Despite of matrinxã has shown excellent growth performance in our fish farms this species is very sensitive to hauling and transport. In this way, studies about matrinxã stress responses to hauling and transport as well strategies to ameliorate these procedures are necessary to improve this species management and consequently reduce economic losses. The present work evaluated the matrinxã stress responses to transport, and the effects of salt (NaCl) and clove oil (Eugenol) dissolved in the water used for transporting the fish. These products have been empirically indicated for transport in Brazil as good alternatives to reduce fish stress during transport. In this way, we observed clove oil could reduce some of the main physiological stress responses of matrinxã as plasma cortisol, glucose and chloride. On the other hand, salt could only reduce some secondary stress responses of matrinxã to transport, which had the main stress indicators recovered 24 h after the end of the 4 h-transport. The high energetic cost to matrinxã was evident through the decreased values of hepatic glycogen after transport. We concluded clove oil and salt can be suggested for matrinxã transport as profilatic products.

**Key words:** matrinxã, *Brycon cephalus*, hauling, transport, NaCl, clove oil eugenol.

## 1. Introdução

O transporte de peixes é uma prática importante em todas as fazendas de piscicultura, bem como nas estações de pesquisas. O matrinxã (*Brycon cephalus*), peixe originário da bacia amazônica, tem se destacado por seus excelentes índices zootécnicos de crescimento e conversão alimentar (Cyrino *et al.*, 1986). Entretanto, conseqüências desastrosas são usualmente observadas no transporte do matrinxã, devido a sua extrema sensibilidade as manipulações necessárias ao longo das práticas de manejo dos cultivos intensivos. Observam-se assim excessivas perdas de muco e escamas, seguida de agressão entre os peixes, manifestação de organismos patogênicos aos peixes e morte (Inoue *et al.*, 2003).

Vários produtos condicionadores como o sal marinho e alguns anestésicos são utilizados no manejo de peixes, sendo a escolha desses produtos feita de acordo com a disponibilidade no mercado, custo mínimo e benefícios trazidos aos peixes (Iwama & Ackerman, 1994). Além do mais, o uso de condicionadores devem proporcionar a suficiente tranquilização dos peixes durante o manejo, sem que sejam observados os efeitos colaterais desses produtos, tais como risco de intoxicações aos trabalhadores e poluição do meio ambiente (Iversen *et al.*, 2003; Pirhonen & Schreck, 2003; Woody *et al.*, 2002).

São descritos alguns benefícios do uso do sal marinho e anestésicos no transporte de peixes vivos com bons resultados na diminuição das principais respostas de estresse (Carneiro & Urbinati, 2001; Kubitza, 1998), porém, esses benefícios não são sempre observados (Barton & Peter, 1982; Carmichael *et al.*, 2001; Kubitza, 2003). Dessa forma, o uso de anestésicos e sal marinho no

transporte de peixes tem sido assunto controverso (Barton & Peter, 1982; Kildea *et al.*, 2004). Assim, mais estudos são necessários a fim de se esclarecer o uso de produtos condicionadores no transporte do matrinxã, bem como gerar mais informações e alternativas nessa importante etapa do manejo de peixes.

No presente trabalho foram avaliados o uso dos condicionadores sal marinho (NaCl) e o óleo de cravo no transporte do matrinxã, medindo-se as principais respostas ao estresse, a fim de se esclarecer e propor novas alternativas. Este trabalho engloba três experimentos, dos quais o primeiro foi um ensaio piloto para o uso do óleo de cravo no transporte do matrinxã. A partir deste ensaio, estabelecemos a concentração de 5 mg/L nos testes do Experimento II. O Experimento III teve a finalidade de se avaliar a recuperação do matrinxã após o transporte em sacos plásticos, testando-se também o uso do sal marinho dissolvido na água de transporte.

## **2. Material e métodos**

Alevinos de matrinxã de mesma idade foram obtidos em uma fazenda comercial de piscicultura localizada na cidade de Mococa, SP e trazidos para as instalações do Laboratório de Bioquímica Adaptativa da Universidade Federal de São Carlos, onde permaneceram estocados por 5 meses. Foram realizados três experimentos distintos, que são descritos a seguir:

### Experimento I

Primeiramente, grupos de 10 peixes permaneceram em caixas com capacidade para 200 L em sistema de circulação fechada de água, aclimatando-se às condições experimentais. Após 15 dias deu-se início aos procedimentos

experimentais. O transporte de peixes foi realizado das 10 às 14 h em sacos plásticos de 50 x 85 cm, supridos com 10 L de água e óleo de cravo nas concentrações de 0, 1, 5 e 10 mg/L. Preencheu-se o espaço remanescente dessas embalagens com gás oxigênio, sendo os sacos plásticos lacrados, de acordo com os procedimentos usuais do transporte de peixes empregados no Brasil. A densidade de peixes nas embalagens foi em torno de 80 g/L, conforme sugerido por Urbinati *et al.* (2004). Dois grupos controle, que não foram manejados nem transportados, permaneceram nas caixas de 200 L em sistema de circulação fechada de água. Assim, 10 peixes foram amostrados às 10 h no momento em que os peixes foram embalados, e após 4 h de transporte (às 14 h) todos os peixes remanescentes foram amostrados.

### Experimento II

Peixes estocados em 1 tanque de 2000 L em sistema de circulação fechada de água foram primeiramente amostrados (10 peixes) para caracterização do grupo Repouso (sem a imposição de qualquer estressor). Sessenta outros peixes desse mesmo tanque foram igualmente distribuídos em seis embalagens, sendo que três receberam óleo de cravo na concentração de 5 mg/L e três permaneceram sem a adição de qualquer produto. As embalagens foram lacradas como descrito no Experimento I e o transporte de peixes realizado por 4 h, das 10 às 14 h, quando todos os peixes foram amostrados.

### Experimento III

Peixes estocados em outro tanque de 2000 litros no sistema de circulação fechada de água foram amostrados para caracterização do grupo controle (sem manuseio e sem transporte). Sessenta outros peixes desse mesmo tanque foram igualmente distribuídos em seis embalagens, sendo que três receberam NaCl na concentração de 6 g/L (grupo 1) e três permaneceram sem a adição de qualquer produto (grupo 2). As embalagens foram lacradas como descrito no Experimento I e o transporte de peixes realizado por 4 h, das 10 às 14 h, quando 10 peixes de cada grupo foram amostrados. Os peixes remanescentes foram respectivamente liberados em caixas de 200 L em sistema de circulação fechada de água, onde os peixes foram amostrados 24 h e 96 h após o transporte dos peixes.

#### Técnicas laboratoriais

Seringas heparinizadas foram utilizadas na coleta de sangue dos peixes. Os valores de hematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971), hemoglobina total (Collier, 1944) e número de células vermelhas do sangue (Lima *et al.*, 1969) foram determinados. Assim, os valores de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados.

Alíquotas de sangue foram também centrifugadas a 14.400 x g por 3 minutos para separação de plasma. Os valores de cortisol plasmático dos Experimentos I e III foram determinados por rádio imuno ensaio (RIA) no Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Já os valores de cortisol plasmático do Experimento II foram obtidos através de método enzimático

(ELISA), de acordo com Basu *et al.* (2001), no Fish Physiology Laboratory do Institute for Marine Biosciences (IMB) do National Research Council of Canada (NRC).

Valores plasmáticos dos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) foram quantificados por fotômetro de chama, enquanto os valores de cloreto (APHA, 1980), proteína total (Lowry *et al.*, 1951), glicose (Trinder, 1969), lactato (Harrower & Brown, 1972) e amônia total (Gentzkow & Masen, 1942) foram determinados por métodos colorimétricos.

Amostras de fígado foram também coletadas para determinação dos valores de glicogênio de acordo com Bidinotto *et al.* (1997).

### **3. Resultados**

Não foi observada mortalidade de peixes durante todos os passos dos experimentos realizados. A água de transporte foi notavelmente deteriorada no decorrer dos procedimentos experimentais, sendo que o sal marinho ( $\text{NaCl}$ ) e óleo de cravo não propiciaram menor deterioração da água de transporte (Tabelas 1 e 2).

Os parâmetros hematológicos não se alteraram significativamente no decorrer dos experimentos, sendo os valores de hematócrito de  $30 \pm 3$  %, hemoglobina total de  $9.8 \pm 1.4$  g/100 ml, número de células vermelhas (RBC) de  $2.2 \pm 0.4 \times 10^6$  células/ $\text{mm}^3$ , volume corpuscular médio (VCM) de  $137 \pm 7$   $\mu\text{mm}^3$ , hemoglobina corpuscular média (HCM) de  $40 \pm 6$  pg e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de  $2.5 \pm 0.1$  %.

Os valores de cortisol plasmático foram visivelmente aumentados após o transporte de peixes, sendo que o óleo de cravo atenuou parte dessa resposta primária do estresse (Tabela 3 e Figura 1). Já o sal marinho (NaCl) não surtiu efeito nos valores de cortisol plasmático (Figura 2).

O matrinxã apresentou valores mais altos de glicose plasmática após o transporte, sendo os aumentos observados nos grupos de peixes transportados com o óleo de cravo e o sal marinho nas concentrações de 5 mg/L e 6 g/L, respectivamente, não significativos em relação aos grupos controle, que não foram submetidos a nenhum estímulo estressante (Figuras 1 e 2). Por outro lado, os grupos de peixes transportados sem a adição de qualquer produto tiveram aumento significativo da glicose plasmática em relação aos grupos controle (não submetidos a qualquer estressor). Os valores de glicose plasmática foram restabelecidos em níveis semelhantes aos iniciais 24 h após o transporte (Figura 2).

O alto custo energético para o matrinxã tolerar o transporte foi evidenciado através dos valores de glicogênio hepático, que foram significativamente diminuídos após o transporte. A adição do sal marinho e do óleo de cravo não surtiu efeito na diminuição dos valores de glicogênio hepático, que somente foram restabelecidos 96 h após a imposição do transporte (Figuras 2 e 5).

Os valores de amônia ( $\text{NH}_4$ ) plasmática aumentaram no matrinxã após o transporte. O óleo de cravo e o sal marinho puderam atenuar o acúmulo de amônia no plasma, em presença dos quais os aumentos não foram significativos em relação aos grupos controle sem a aplicação de qualquer estímulo estressante (Figuras 3 e 4). Por outro lado, os grupos de peixes transportados sem a adição

de qualquer produto apresentaram aumentos significativos da amônia plasmática em relação aos grupos controle (sem a imposição de qualquer estressor). Os valores de amônia plasmática foram restabelecidos em níveis semelhantes aos iniciais 24 h após o transporte (Figuras 3 e 4).

Os valores de  $\text{Na}^+$  plasmático não foram significativamente diminuídos após o transporte no Experimento II. Entretanto, no Experimento III ocorreu uma queda significativa dos valores de sódio plasmático após o transporte, sendo essas variáveis restabelecidas 24 h após o transporte. A adição de sal marinho na água de transporte não reduziu as perdas de sódio no matrinxã (Tabela 4, Figura 6).

Os valores de  $\text{K}^+$  plasmático permaneceram constantes no matrinxã durante todo o Experimento III. Já no Experimento II os valores de potássio  $\text{K}^+$  plasmático caíram significativamente após o transporte (Tabela 4, Figura 6). A adição de óleo de cravo na concentração de 5 mg/L diminuiu as perdas de potássio plasmático no matrinxã, que nessa condição de transporte apresentou teores significativamente iguais aos grupos controle sem a imposição de qualquer estímulo estressante (Figura 6).

O matrinxã apresentou menores valores de cloreto plasmático após o transporte, sendo que o óleo de cravo, na concentração de 5 mg/L, reduziu as perdas desse íon (Figura 6). Os valores foram significativamente semelhante aos grupos controle sem a imposição de qualquer estímulo estressante. O sal marinho na concentração de 6 g/L não reduziu as perdas de cloreto plasmático no matrinxã submetido ao transporte, sendo entretanto, esses valores restabelecidos 24 h após o transporte do matrinxã (Tabela 4).

Os valores de proteína plasmática permaneceram constantes no Experimento II. Por outro lado, os valores de proteína plasmática foram significativamente diminuídos após o transporte no Experimento III (Tabela 4). A adição do sal marinho na água de transporte na concentração de 6 g/L não reduziu significativamente as perdas de proteína plasmática no matrinxã, sendo os esses valores restabelecidos 24 h após o transporte.

#### **4. Discussão**

O transporte de peixes vivos em sacos plásticos tem sido bastante relatado para muitas espécies de peixes do Brasil (Kubitza, 2003). Pois, tal prática de manejo é um estímulo agudo aos peixes, promovendo muitas das respostas ao estresse (Barton *et al.*, 2002), usualmente detectadas através das alterações dos valores de cortisol, glicose e íons plasmáticos (Wendelaar-Bonga, 1997). No presente trabalho foi estudado o transporte do matrinxã em sacos plásticos por 4 horas, associando-se o uso de condicionadores como o sal marinho e o óleo de cravo. O sal marinho não apresentou efeito na diminuição da resposta do cortisol plasmático, enquanto o óleo de cravo pôde parcialmente atenuar o aumento do cortisol plasmático no matrinxã submetido ao transporte.

Os grupos de matrinxãs transportados sem a adição de qualquer produto e com adição do sal marinho na água de transporte apresentaram aumentos significativos dos valores de cortisol plasmático, os quais certamente foram em resposta a um conjunto de estressores, composto pela manipulação direta dos peixes na confecção das embalagens, vigorosa atividade muscular, exposições dos animais à baixa qualidade da água durante o transporte e o próprio transporte,

que pela movimentação constante das embalagens pode causar injúrias nos peixes (McDonald & Milligan, 1997). De maneira semelhante, no transporte da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) observou-se que o uso do sal marinho e da tricaina metanosulfonate (MS 222) não reduziram os valores do cortisol plasmático (Barton & Peter, 1982).

O uso do óleo de cravo diluído na água de transporte reduziu as respostas de cortisol plasmático do matrinxã, sugerindo o seu uso nessa importante prática de manejo de peixes. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual o óleo de cravo atenua a resposta de cortisolêmia no matrinxã é ainda desconhecido. Os estudos sobre os efeitos do óleo de cravo nas respostas de estresse em peixes foram somente realizados em concentrações bem mais altas do que as ensaiadas no presente capítulo (10-140 mg/L) e por períodos bem mais curtos (1-30 minutos) (Iversen *et al.*, 2003; Small, 2004; Woody *et al.*, 2002; Keene *et al.*, 1998), os quais também evidenciaram que alguma resposta do cortisol plasmático pôde ser reduzida. O salmão do atlântico (*Salmo salar*), quando exposto a concentrações de 20 a 100 mg/L de óleo de cravo durante 10 min, não apresentou elevação dos valores de cortisol plasmático em resposta ao manejo e anestesia (Iversen *et al.*, 2003). De forma semelhante, o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) anestesiado em 100 mg/L de óleo de cravo apresentou menores elevações do cortisol plasmático (Small, 2004). Iversen *et al.* (2003) especulam que o óleo de cravo possa parcialmente bloquear a transmissão dos impulsos nervosos para o hipotálamo, onde são desencadeadas as demais reações do sistema nervoso central nas respostas de estresse, entre elas a cortisolêmia.

O uso do óleo de cravo e do sal marinho no transporte do matrinxã reduziram a concentração da glicose plasmática, que é classicamente citada como uma resposta secundária ao estresse, desencadeada pelo aumento do cortisol plasmático (Hattingh, 1976). De maneira semelhante, Carneiro & Urbinati (2001) observaram que o sal marinho pôde parcialmente atenuar os aumentos de cortisol e glicose plasmática do matrinxã submetido ao transporte em caixas semitêrmicas. Iversen *et al.* (2003) observaram que o salmão do atlântico (*Salmo salar*), exposto ao óleo de cravo por 30 minutos, não apresentou também elevações nos valores de glicose plasmática.

Durante o transporte de peixes, a disponibilidade de oxigênio nas células pode muitas vezes ser diminuída por ocasião da elevada atividade muscular, resultante do intenso esforço de natação dos peixes para manutenção da posição normal de nado nas embalagens em movimento (Barton *et al.*, 1998). Dessa forma, aumentos nos valores de lactato plasmático são esperados, o que foi prontamente observado no Experimento II. O óleo de cravo atenuou também o acúmulo do lactato plasmático no matrinxã, muito provavelmente devido à menor movimentação do matrinxã nas embalagens que continham essa substância, já que os peixes apresentavam-se aparentemente tranqüilizados.

Exposições de peixes a anestésicos provocam também fortes alterações nas taxas respiratórias, sendo assim possível maior acúmulo de lactato no plasma (Iversen *et al.*, 2003). Entretanto, o óleo de cravo na concentração de 5 mg/L não foi suficiente para interferir nos esforços respiratórios do matrinxã durante o transporte, justificando o seu uso nas embalagens para tranqüilizar os peixes sem interferir na respiração dos mesmos.

A excreção nitrogenada em peixes acontece através das brânquias por difusão da amônia (Wright, 1993). Durante o transporte, os gradientes de concentrações da amônia entre o sangue e a água de transporte tendem a diminuir intensamente com o passar das horas, dificultando assim a excreção nitrogenada. Nossos resultados confirmam essas observações, já que o matrinxã apresentou maiores valores de amônia plasmática associada à alta concentração de amônia na água de transporte. O óleo de cravo e o sal marinho atenuaram o acúmulo de amônia plasmática no matrinxã submetido ao transporte. É provável que o óleo de cravo tenha diminuído o acúmulo de amônia plasmática devido à menor movimentação dos peixes durante o transporte, e conseqüentemente houve um menor prejuízo na excreção nitrogenada. Já para o sal marinho, existe um mecanismo descrito evidenciando a troca de íons  $\text{NH}_4^+$  do meio interno por íons  $\text{Na}^+$  do meio externo, levando assim a menores valores de amônia plasmática (Carneiro & Urbinati, 2001).

O desbalanço eletrolítico em peixes tem sido descrito em resposta ao estresse como conseqüência das elevações das concentrações de catecolaminas e do cortisol (Mc Donald & Milligan, 1997). O matrinxã apresentou nítidos distúrbios na regulação osmótica, sendo isso indicado nos valores de sódio, cloreto, potássio e proteína plasmática. O matrinxã apresentou menores valores de sódio plasmático após o transporte, tendo o óleo de cravo atenuado alguma perda de sódio. Já o matrinxã, transportado com a adição de sal na água de transporte, apresentou menores perdas de sódio, mas as diferenças em relação aos peixes transportados sem a adição de qualquer produto na água de transporte não foram significativas.

Os valores de cloreto plasmático apresentaram-se menores logo após o transporte, de forma semelhante ao observado por Barton *et al.* (2002), Forsberg *et al.* (2001) e Mazik *et al.* (1991). O sal marinho e o óleo de cravo atenuam de certa forma as perdas de cloreto plasmático durante o transporte, tal como reportado por Carneiro & Urbinati (2001) para o transporte do matrinxã em caixas semitérmicas. Entretanto, a característica do sal marinho e do óleo de cravo em diminuir as perdas de íons cloreto durante o transporte não pode ser generalizada para todas as espécies de peixes, já que “walleys” (*Sander vitreus*) apresentam perda de cloreto durante o transporte, não sendo evitada as perdas de cloreto através da adição de sal na água de transporte em concentração de 5 g/L (Carmichael *et al.*, 2001).

As perdas de NaCl plasmático do matrinxã foram bastante acentuadas, mostrando também que essa espécie é bastante resistente às perdas iônicas sem a observação de mortalidade de peixes. Em salmão (*Salmo salar*), cuja perda de NaCl plasmático chegou 35 %, observou-se elevada taxa de mortalidade em resposta ao manejo (McDonald & Milligan, 1997). Os valores de potássio e proteína plasmática apresentaram certa queda após o transporte do matrinxã, embora esses parâmetros não tenham sido indicadores fortes do estresse nessa espécie.

Acredita-se, nas condições de campo, que o uso de condicionadores no transporte de peixes vivos possa reduzir a atividade muscular dos peixes, a excreção nitrogenada e conseqüentemente maior quantidade de peixes poderiam ser transportados num mesmo espaço (Kubitza, 1998; Kubitza, 2003). Entretanto, os resultados do presente capítulo contradizem tal idéia, uma vez que a qualidade

da água após o transporte evidentemente deteriorou; e o uso do sal marinho e do óleo de cravo não proporcionaram menores concentrações de amônia na água de transporte.

Os valores de oxigênio dissolvido na água de transporte estiveram altos pelo fato de se utilizar oxigênio puro para atingir a super saturação da água, a qual aparentemente não resultou em efeitos deletérios aos matrinxãs. Esse fato é bastante comum nas fazendas brasileiras na realização das operações de transporte de peixes em sacos plásticos (Kubitza, 2003).

O transporte em sacos plásticos é um procedimento prático de extrema severidade ao matrinxã, cujo custo energético alto ficou evidente através da diminuição dos valores de glicogênio hepático. O óleo de cravo e o sal marinho não proporcionaram melhores condições para menores reduções dos estoques de glicogênio hepático.

Dentre os parâmetros analisados no presente trabalho, o uso do sal marinho e do óleo de cravo atenuam algumas das respostas ao estresse de transporte em sacos plásticos, sugerindo que esses produtos condicionadores possam ser usados com alguns benefícios durante essa prática estressante do manejo para o matrinxã.

Tabela 1. Qualidade da água de transporte de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo (5 mg/L). Amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) foi calculada a partir das concentrações de amônia total em relação ao pH e a temperatura da água. Grupo Repouso foi composto por peixes sem a imposição de estressores, já grupo Controle foi composto por peixes transportados sem a adição de qualquer produto na água de transporte.

Condição	Amônia total $\text{NH}_4$ mg/L	Amônia não ionizada $\text{NH}_3$ mg/L	pH	Temperatura °C	Oxigênio mg/L
Repouso	$0.87 \pm 0.12$	$0.05 \pm 0.01$	$7.8 \pm 0.4$	$24.1 \pm 0.1$	$5.03 \pm 0.2$
Óleo de cravo 5 mg/L	$7.97 \pm 0.52$	$0.04 \pm 0.01$	$6.8 \pm 0.06$	$24.1 \pm 0.1$	$19.31 \pm 0.52$
Controle	$8.07 \pm 1.05$	$0.04 \pm 0.02$	$6.7 \pm 0.2$	$24.1 \pm 0.1$	$16.89 \pm 1.25$

Tabela 2. Qualidade da água ao longo do Experimento III. Juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) foram transportados por 4 h em sacos plásticos supridos ou não com sal marinho (6 g/L).

Condição	Temperatura (°C)	Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )	Amônia total (mg L <sup>-1</sup> )
Sem adição			
transporte	27.2	9.07	9.987
rec. 24h	26.8	4.13	0.845
rec. 96h	27.0	4.70	0.799
Sal marinho			
transporte	27.6	9.63	10.685
rec. 24h	26.8	4.27	0.851
rec. 96h	27.0	4.70	0.782
Controle	29.2	5.17	0.793

Tabela 3 - Efeito do óleo de cravo no cortisol (ng/ml) e glicose (mg/dL) plasmática do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte em sacos plásticos. Grupos controle (controle antes e controle após) foram respectivamente amostrados antes e após o transporte.

Tratamento Plasma	Controle Antes	Óleo de cravo (mg/L)				Controle Após
		0	1	5	10	
Cortisol	12.2 ± 1.8	26.3 ± 1.2	30.7 ± 5.2	23.8 ± 1.7	22.0 ± 1.5	11.7 ± 1.2

Glicose       $95.5 \pm 3.7$      $163.3 \pm 3.3$      $180.0 \pm 3.4$      $133.3 \pm 2.5$      $155.5 \pm 2.9$      $95.5 \pm 1.8$

---

Tabela 4.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e proteína no plasma do matrinxã ao longo do Experimento III. Juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) foram transportados por 4 h em sacos plásticos supridos ou não com sal marinho (6 g/L). Peixes foram amostrados antes (Controle) e após o transporte, bem como após 24 h e 96 h de recuperação.

Condição	$\text{Na}^+$ mEq/L	$\text{Cl}^-$ mEq/L	Proteína mg/L
Sem adição			
Transporte	$42.8 \pm 15^*$	$61 \pm 3^*$	$0.14 \pm 0.01^*$
rec. 24h	$98.2 \pm 11$	$171 \pm 20$	$0.24 \pm 0.04$
rec. 96h	$111.2 \pm 3$	$169 \pm 18$	$0.36 \pm 0.02$
Sal marinho			
Transporte	$58.3 \pm 4^*$	$81 \pm 9^*$	$0.15 \pm 0.02^*$
rec. 24h	$109.0 \pm 2$	$186 \pm 6$	$0.28 \pm 0.03$
rec. 96h	$107.7 \pm 7$	$183 \pm 17$	$0.33 \pm 0.05$
Controle	$102.0 \pm 11$	$174 \pm 19$	$0.30 \pm 0.03$

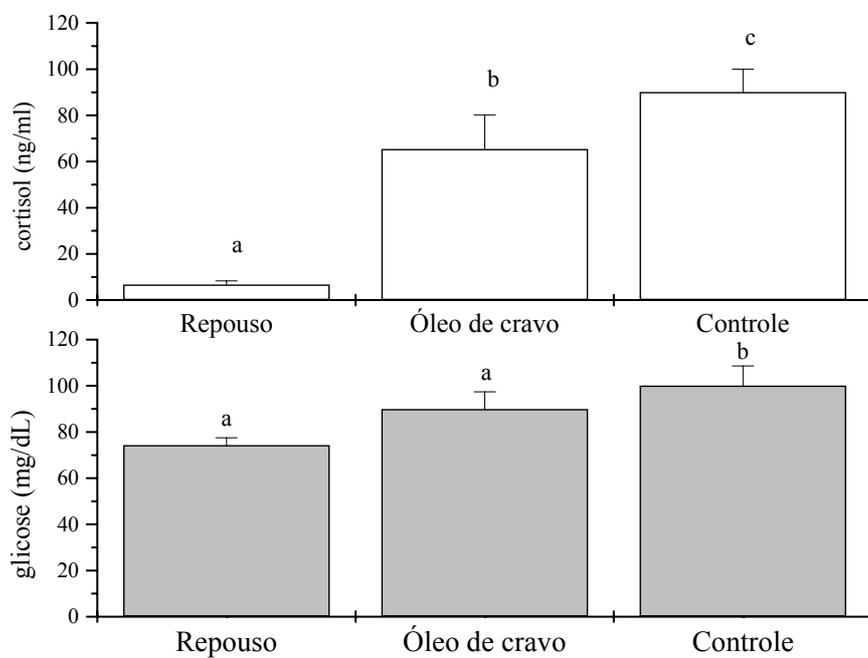


Figura 1 – Efeito do óleo de cravo no cortisol plasmático do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. Óleo de cravo foi utilizado na concentração de 5 mg/L, Grupo Controle foi submetido ao transporte sem a adição de qualquer produto. Grupo repouso foi composto de peixes somente amostrados sem a imposição de qualquer estressor.

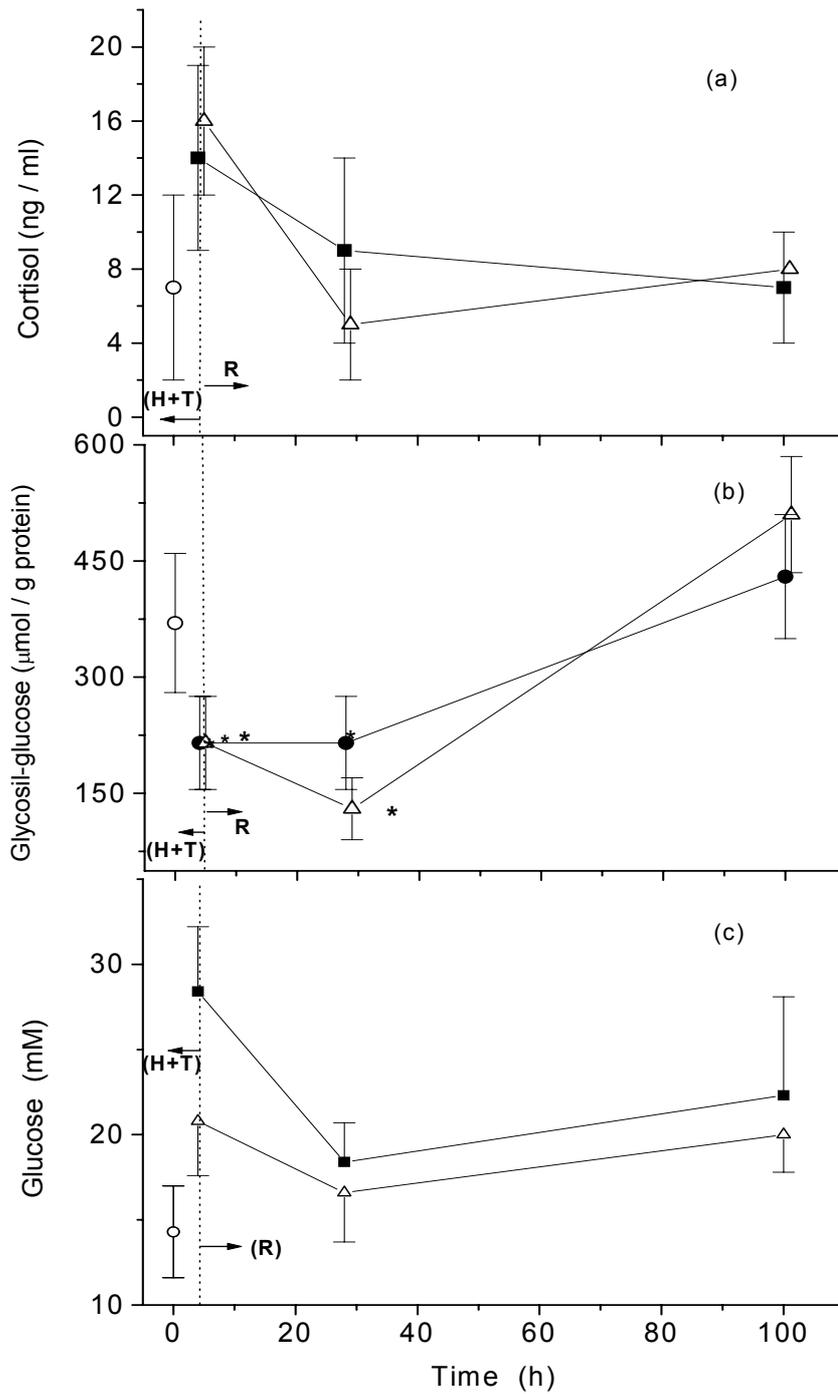


Figura 2 – Cortisol plasmático (a), Glicogênio hepático (b) e glicose plasmática (c) ao longo do Experimento III. Juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) foram transportados por 4 h em sacos plásticos supridos ou não de sal marinho. Água doce (■) sal marinho 6g/L (△). Recuperação dos peixes foi realizada em água doce.

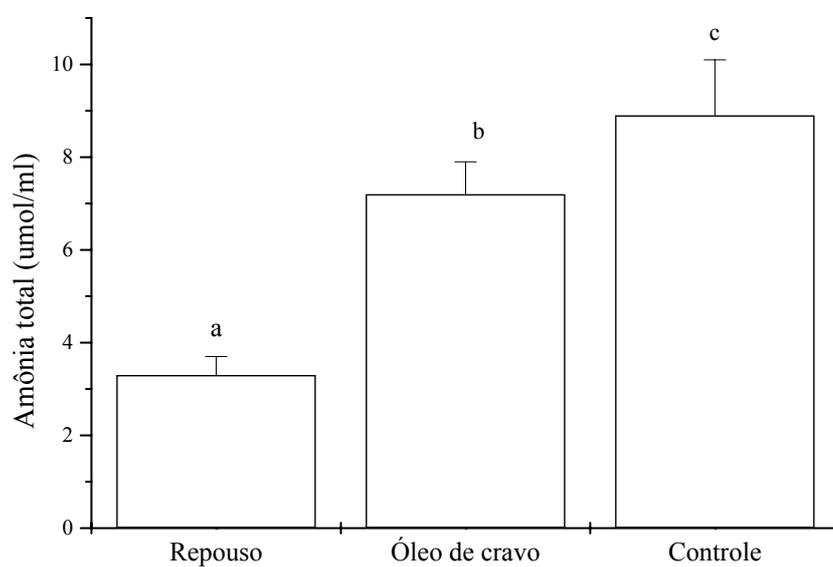


Figura 3 – Amônia plasmática de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) submetidos ao transporte em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo na concentração de 5 mg/L. Grupo controle constituído de peixes transportados sem a adição de qualquer produto na água de transporte. Grupo repouso constituído de peixes somente amostrados sem a imposição de qualquer estressor.

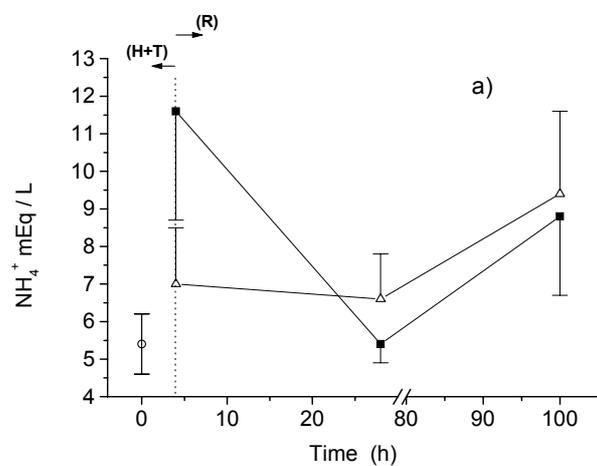


Figura 4 – Amônia plasmática ao longo do Experimento III. Juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) foram transportados por 4 h em sacos plásticos supridos ou não de sal marinho. Água doce (■) sal marinho 6g/L ( $\Delta$ ). Recuperação dos peixes foi realizada em água doce.

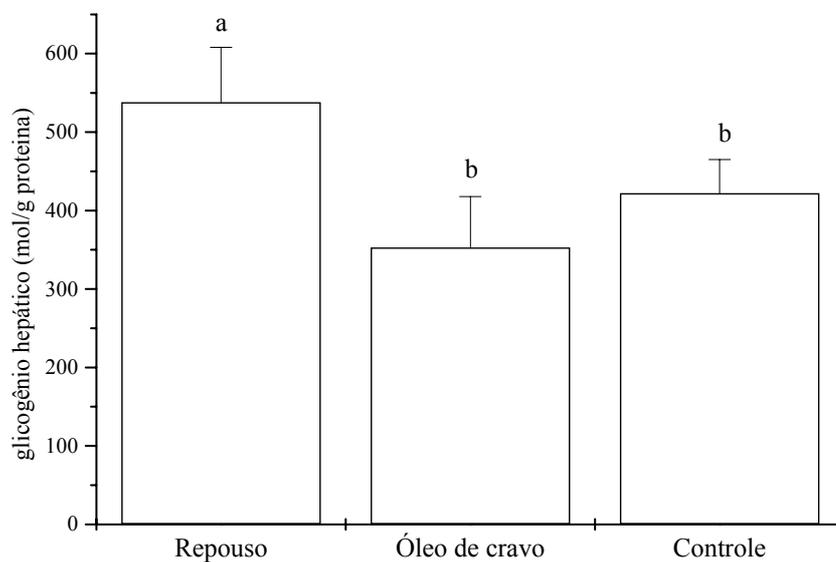


Figura 5 – Glicogênio hepático de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) submetidos ao transporte em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo na concentração de 5 mg/L. Grupo controle constituído de peixes transportados sem a adição de qualquer produto na água de transporte. Grupo repouso constituído de peixes somente amostrados sem a imposição de qualquer estressor.

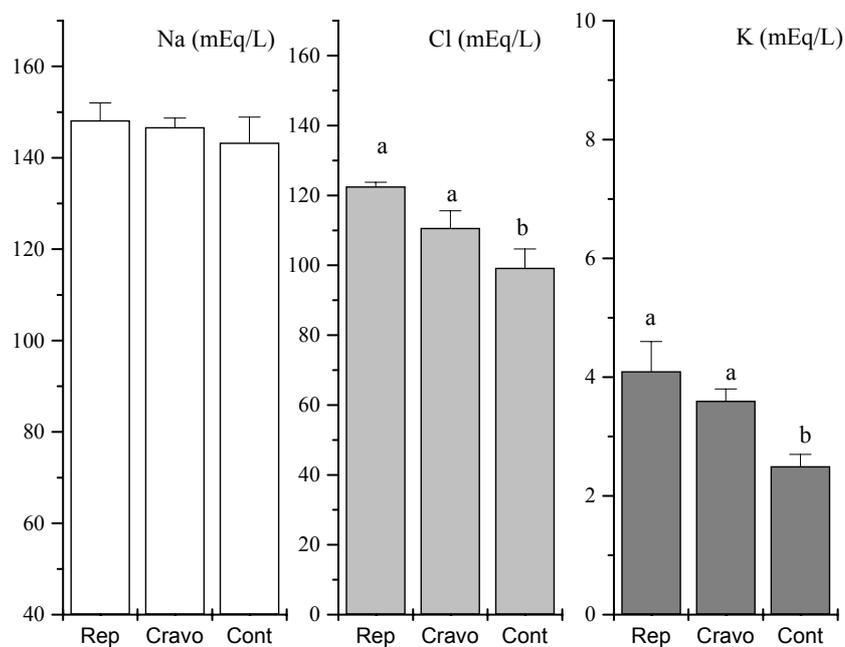


Figura 6 – Valores de sódio, cloreto e potássio plasmáticos em juvenis de matrinxã submetidos ao transporte em sacos plásticos com a adição de óleo de cravo na concentração de 5 mg/L. Grupo controle (Cont) constituído de peixes transportados sem a adição de qualquer produto na água de transporte. Grupo repouso (Rep) constituído de peixes somente amostrados sem a imposição de qualquer estressor.

## 5. Referências bibliográficas

APHA. **Standard methods for determinations of water and wastes**. 12 ed. Joint Editorial board, Washington, DC, 1980, 543 p.

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

BARTON, B. et al. Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 120, n. 2, p. 355-363, 1998.

BARTON, B., MORGAN, J.D., VIJAYAN, M.M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: Adams S.M. (Ed.). **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, Bethesda. p. 111-148. 2002.

BASU, N., NAKANO, T., GRAU, E.G., IWAMA, G.K. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 97-105, 2001.

BIDINOTTO, P.M., SOUZA, R.H.S., MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. **Boletim Técnico do Cepta**, v. 10, p. 53-60, 1997.

- CARMICHAEL, G.J., TOMASSO, J.R., SCHWEDLER, T.E. Fish transportation. In: Wedemeyer, G.A. (Ed.). **Fish Hatchery Management**. 2<sup>nd</sup> edition, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p. 641-660, 2001.
- CARNEIRO, P.C.F., URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 297-304, 2001.
- CYRINO, J.E.P., CASTAGNOLLI, N., PEREIRA-FILHO, M. Digestibilidade da proteína de origem animal e vegetal pelo matrinxã (*Brycon cephalus* GUNTHER, 1869) (Eusteiostei, Characiformes, Characidae) In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA**, 4, 1986, Cuiabá, Anais... Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, Funep, 1986, 49-62.
- COLLIER, H.B. The standadization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.
- FORSBERG, J.A., SUMMERFELT, R.C., BARTON, B. Physiological and Behavioral Stress Responses of Walleyes Transported in Salt and Buffered-Salt Solutions. **North American Journal Aquaculturist**, v. 63, n. 3, p. 191-200, 2001.
- GENTZKOW, C.J., MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 143, p. 531-544, 1942.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

- HARROWER, J.R., BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, n. 5, p. 224-228, 1972.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. **Journal of Fish Biology**, v. 10, p. 191-195, 1976.
- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n.5, p. 943-947, 2003.
- IVERSEN, M., FINSTAD, B., MCKINLEY, D. ELIASSEN, R. The efficacy of metomidate, clove oil, aqui-s and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.
- IWAMA, G., ACKERMAN, P. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P., MOMMSEN (Eds.). **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**, 3, p. 1-15. Elsevier Science, Amsterdan, 1994.
- KEENE, J.L., NOAKES, D.L.G., MOCCIA, R.D., SOTO, C.G. The efficacy of clove oil as an anesthetic for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, n. 2, p. 89-101, 1998.
- KILDEA, M., ALLAN, G., KEARNEY, R. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and Aqui-S<sup>TM</sup> from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.
- KUBITZA, F. **Técnicas de transporte de peixes vivos**. Aqua & Imagem. Campo Grande MS. 1998. 44p.

KUBITZA, F. Amenizando as perdas de alevinos após o manejo e transporte.

**Panorama da Aqüicultura**, v. 13, p. 15-25, 2003.

LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J., CANÇADO, J. **Métodos de laboratório aplicados à clinica**. 4<sup>th</sup> edition. Guanabara Koogan, R.J. 1969. 653 p.

LOWRY, D.H., ROSENBROUGH, N.J., FAR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

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

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

PIRHONEN, J., SCHRECK, C.B. Effects of anesthesia with MS 222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 507-514, 2003.

SMALL, B.C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Aquaculture**, v. 238, p. 469-481, 2004.

- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Analytical Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24-27, 1969.
- URBINATI, E. ABREU, J. CAMARGO, A. PARRA, M. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiology Review**, v. 77, p. 591-625, 1997.
- WOODY, C.A., NELSON, J., RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 340-347, 2002.
- WRIGHT, P.A. Nitrogen excretion and enzyme pathways for ureagenesis in freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Physiology Zoology**, v. 66, p. 881-901, 1993.

## CAPÍTULO 6

### **Respostas fisiológicas ao estresse do matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) submetido a um choque frio abrupto**

**Resumo-** O presente trabalho avaliou as principais respostas fisiológicas e celulares ao estresse do peixe de águas tépidas matrinxã (*Brycon cephalus*), quando submetido a um choque frio abrupto. Essa espécie vem sendo amplamente cultivada na América do Sul por apresentar índices zootécnicos de

crescimento e conversão alimentar desejáveis. Entretanto, os produtores rurais encontram limitações no manejo dessa espécie, quando criado em regiões mais frias que sua região de origem, a bacia amazônica. Assim, o matrinxã foi submetido a um choque frio abrupto através da transferência direta dos peixes para tanques com água fria a 18 °C. Após 1 h, esses peixes foram retornados às suas caixas de origem a 28 °C. O manuseio de peixes necessário para conduzir o choque térmico experimental foi também imposto aos grupos controle, sendo, entretanto, evitada a água fria. O matrinxã demonstrou claros sinais de estresse fisiológico durante os procedimentos experimentais. Porém, essas respostas não foram associadas ao choque frio, mas sim ao choque quente por ocasião da volta dos peixes para as caixas de origem. As respostas primárias e secundárias ao estresse foram evidentes através dos aumentos nos valores plasmáticos de cortisol e glicose. Já o hematócrito, a hemoglobina e as expressões da proteína de estresse, hsp-70, não foram afetadas. Nossos resultados sustentam que o matrinxã falhou em responder ao choque frio, mas não ao choque quente, que é um estressor evidentemente associado à origem natural dessa espécie de águas de temperaturas elevadas.

**Palavras-chaves:** matrinxã, estresse, choque térmico, hsp 70.

**Abstract** – PHYSIOLOGICAL STRESS RESPONSE IN THE WARM-WATER FISH MATRINXÃ (*BRYCON CEPHALUS*) EXPOSED TO A SUDDEN COLD SHOCK. The present work evaluated several aspects of the generalized stress response: endocrine (cortisol), metabolic (glucose), hematologic (hematocrit and

hemoglobin), and cellular (hsp-70) in the warm-water fish matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to an acute cold shock. This is a characidae species from the Amazon basin widely raised in the South America due to its good market and aquaculture characteristics. In subtropical areas, where the water temperature can rapidly change, high rates of mortality have been associated with abrupt decrease in the water temperature. Thus, we imposed matrinxã to a sudden 1h-cold shock by transferring directly the fish to tanks in which the water temperature was 10 °C below the initial conditions (cold shock from 28 °C to 18 °C). After 1 h the fish were returned to the original tanks (28° C). The necessary handling was also imposed to control groups (not exposed to cold shock). While exposure to cold shock did not affect the stress response in matrinxã, return of the fish to the prior condition (water at 28° C) significantly increased plasma cortisol and glucose levels. Exposure to cold shock and return to the warm water did not affect hsp-70 levels. Thus, matrinxã responded to the cold shock by not eliciting components of the main physiological stress response. However, the increased plasma cortisol and glucose levels after returning the fish to warm water suggest that matrinxã requires cortisol and glucose for *de novo* adaptation to increased temperatures.

**Keywords:** matrinxã, cold shock, stress, cortisol, glucose, hsp-70.

## 1. Introdução

As pesquisas em aquicultura têm se concentrado no desenvolvimento de novas técnicas para o desenvolvimento sustentado da atividade, que dia-a-dia requer mais estudos científicos, para se esclarecer muitas questões advindas da

experiência prática no campo. Um dos problemas mais comuns nas fazendas de produção comercial de peixes tropicais tem sido o estresse sofrido pelos peixes por ação de abruptas mudanças na temperatura da água. Isso é especialmente mais observado nas fazendas em que as oscilações de temperatura da água são mais acentuadas, em relação às variações de temperatura da água, encontradas nas regiões de origem das diferentes espécies de peixes cultivados. Além do mais, o transporte de peixes, quando realizado de maneira inadequada, pode também expor os animais a choques térmicos.

Enquanto as respostas de estresse aos choques quentes nos peixes de água fria são bastante investigadas, poucos estudos têm sido desenvolvidos com peixes de águas quentes associados ao abaixamento da temperatura da água. Assim, o presente estudo investigou os efeitos de um abrupto choque frio nas respostas de estresse de um peixe de água quente bastante cultivado no Brasil e outros países da América do Sul. O matrinxã (*Brycon cephalus*) é um peixe da bacia amazônica, que tem apresentado bons índices zootécnicos de crescimento e conversão alimentar nas fazendas brasileiras, além de suas características positivas para a pesca esportiva, que o promovem nos estabelecimentos de pesque-pague (Cyrino *et al.*, 1986).

O presente trabalho investigou as principais respostas do matrinxã ao choque térmico frio através dos valores sanguíneos de hematócrito e hemoglobina total, bem como os plasmáticos de cortisol e glicose (Mazeud *et al.*, 1977). Investigou-se também o estresse do matrinxã a mudanças abruptas de temperatura da água em nível celular através dos esforços na detecção dos níveis citoplasmáticos da proteína de estresse hsp-70. As proteínas de estresse (hsps)

são chaperoninas moleculares, cujas funções no citoplasma são de auxiliar no dobramento, desdobramento, agregação e reparo de demais proteínas da célula (Iwama *et al.*, 2004). Em determinadas situações danos celulares por ação, por exemplo, de abruptas mudanças de temperatura da água seriam esperados, e níveis acima dos constitutivos das hsp no citoplasma seriam também esperados.

## **2. Material e métodos**

Duzentos e quarenta peixes ( $91,3 \pm 24,8$  g and  $18,8 \pm 1,7$  cm) foram igualmente distribuídos em 6 caixas de  $2 \text{ m}^3$  na proporção de 40 peixes/caixa nas instalações do Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos. O abastecimento de água foi em sistema fechado com recirculação, permanecendo a temperatura em  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Demais parâmetros da qualidade da água foram também monitorados (oxigênio dissolvido  $5,66 \pm 0,07$  mg/l, condutividade  $74,3 \pm 4,8$   $\mu\text{S}\cdot\text{cm}$  e pH 7,0) por 1 mês. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial extrusada com 32 % de proteína, sendo oferecida até a saciedade. Um dia antes do experimento a alimentação foi suspensa.

### Desenho experimental

Seis tanques (200 litros) foram utilizados nos procedimentos experimentais, sendo que três continham água fria a  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  (grupo de choque térmico) e três continham água à temperatura normal de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  (grupo controle). Assim, o desenho experimental deu-se como segue: 1) os peixes inicialmente estocados

nas caixas de 2 m<sup>3</sup> foram transferidos para as caixas de 200 L, aí permanecendo por 1 h. 2) os peixes então retornaram para os tanques iniciais de 2 m<sup>3</sup>. A temperatura da água e a concentração de oxigênio dissolvido foram monitoradas através de um oxímetro YSI modelo 55. Tais procedimentos foram realizados a fim de que se submeter os matrinxãs a abruptas mudanças de temperatura. As amostragens dos peixes foram realizadas antes e 0, 1, 3, 6, 12 e 24 h após os procedimentos experimentais.

### Análises laboratoriais

Utilizaram-se seringas heparinizadas na coleta de sangue para determinação do hematócrito (Collier, 1944) e a concentração de hemoglobina total (Drabkin, 1948). Alíquotas de sangue foram também centrifugadas para separação de plasma, que foi utilizado posteriormente nos ensaios de glicose (Trinder, 1969) e cortisol plasmático (Basu *et al.* 2001), no Laboratório de Fisiologia de Peixes do Institute for Marine Biosciences do National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canadá. Amostras de brânquia, fígado e músculo branco foram ainda coletadas e armazenadas em tubos Eppendorf, para posteriores análises da proteína de estresse hsp70 (Laemmli, 1970), na mesma Instituição.

As concentrações de proteína foram determinadas de acordo com Smith *et al.* (1985) através do método do ácido bicinônico (BCA). As leituras de absorvância foram realizadas em 550 nm. Os níveis de hsp70 foram medidos através de eletroforese em gel descontínuo de SDS-policrilamida (SDS-PAGE), seguida de transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose através

de Westen Blotting para Imunodeteção em banhos de anticorpos primários e secundários sigma monoclonal anti-hsp70 e “anti-mouse” IgG, respectivamente.

### Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e posteriormente foi aplicado o teste LSD para comparação de médias.

### **3. Resultados**

Não foi observada mortalidade de peixes durante os procedimentos experimentais. Os valores de hematócrito (controle =  $33,0 \pm 1,9$  % e choque térmico =  $34,1 \pm 1,9$  %;  $F=1,70$ ,  $p=0,09$ ) e hemoglobina total (controle =  $9,28 \pm 1,48$  mg/100mL e choque térmico =  $9,26 \pm 1,48$  mg/100 mL;  $F=1,59$ ,  $p=0,10$ ) não foram afetados nem pelo choque térmico frio nem pelo manuseio conduzido para a realização do choque térmico.

Os valores de cortisol plasmático apresentaram-se significativamente ( $P<0,05$ ) superiores nos grupos submetidos ao choque térmico somente 1 h após os procedimentos experimentais, permanecendo assim até 6 h após a aplicação dos estímulos estressantes (Figura 1). Os valores de glicose plasmática apresentaram a mesma tendência do cortisol (Figura 2).

A proteína de estresse hsp70 foi detectada somente nas brânquias (Figura 3), embora fora ensaiada nos demais tecidos (fígado e músculo branco). O choque térmico experimental não alterou significativamente ( $P<0,05$ ) os níveis da proteína de estresse hsp70 nem pela abrupta queda na temperatura da água nem pelo brusco aumento da mesma por ocasião do retorno dos peixes às caixas iniciais.

#### 4. Discussão

Foi observado no presente trabalho que o matrinxã não foi responsivo ao choque frio em nível primário, secundário e celular. Porém, apresentou respostas fisiológicas evidentes, quando os peixes foram retornados dos tanques de água fria (18 °C) para os tanques originais com água a 28 °C. Esse perfil de resposta fisiológica parece estar fortemente relacionado à origem do matrinxã, que vem da bacia amazônica, onde as águas são constantemente tépidas (Goulding, 1980). Ainda, o matrinxã não apresentou resposta celular aos procedimentos experimentais.

Os níveis iniciais dos parâmetros analisados estiveram de acordo com os níveis basais descritos em outros estudos de estresse em matrinxã. Dessa forma, os valores de cortisol foram semelhantes aos observados em diversos estudos da espécie em questão (Carneiro & Urbinati, 2001; Urbinati *et al.*, 2004). De igual forma, foram os valores de glicose, hematócrito e hemoglobina total (Roubach *et al.*, 2001; Avilez *et al.*, 2004; Urbinati *et al.*, 2004). Além do mais, os aumentos significativos dos níveis de cortisol e glicose plasmática ao longo dos procedimentos experimentais indicam que o matrinxã é uma espécie responsiva e adequada como modelo para o estudo das respostas de estresse a abruptas mudanças de temperatura da água.

Os valores sanguíneos de hematócrito e hemoglobina total apresentaram-se constante durante os procedimentos experimentais. De acordo com a bibliografia levantada para o matrinxã, esse é o primeiro estudo avaliando os

efeitos de mudanças abruptas na temperatura da água sobre esses parâmetros sanguíneos. Alterações nos valores de hematócrito e hemoglobina total têm sido descritas em resposta a outros estressores mais agudos e duradouros no matrinxã, como a exposição dos peixes a compostos químicos em concentrações próximas às letais (Avilez *et al.*, 2004). Ainda, a ausência de mudanças nos parâmetros sanguíneos parece reforçar que as condições pré-experimento e de recuperação dos peixes aos estímulos experimentais foram adequadas no presente capítulo.

Embora o choque frio fosse supostamente o estressor a induzir as respostas fisiológicas mais intensas no presente capítulo, ambos os indicadores de estresse (cortisol e glicose) mostraram que o matrinxã foi responsivo apenas por ocasião da volta às condições iniciais de água com temperatura de 28 °C. A amostragem de peixes referente ao tempo 0 h após o choque térmico frio, na verdade, corresponde a 1 h após o início da exposição dos peixes à água fria. Entretanto, não foram detectadas respostas da glicose e do cortisol plasmático. Dessa forma, os nossos grupos controle apresentaram aumentos de cortisol e glicose do plasma imediatamente após a imposição do estresse de manuseio, semelhantemente a outros estudos com matrinxã (Urbinati *et al.*, 2004). Assim, a ausência de resposta do matrinxã logo após a exposição dos peixes à água fria corrobora que não o choque térmico frio, mas sim o choque térmico quente por ocasião da volta dos peixes às condições iniciais foi o estressor mais severo no presente capítulo.

As respostas de estresse foram mais acentuadas nos grupos experimentais submetidos ao choque frio, os quais apresentaram os valores máximos de cortisol plasmático somente 1 h após o encerramento da imposição desse estressor. Urbinati *et al.* (2004) observaram que o matrinxã apresentou elevações do cortisol plasmático poucos minutos após a imposição de estressores como o manuseio (Hauling) conduzido para a confecção de embalagens para o transporte de peixes em sacos plásticos. Assim, confirma-se no presente capítulo o matrinxã foi responsivo ao choque quente realizado no retorno dos peixes às condições iniciais de temperatura (28 °C), e não ao choque térmico frio como esperado.

O perfil de resposta do matrinxã é assim diretamente relacionado às condições da historia natural dessa espécie. Porém, ainda não é possível afirmar que a resposta fisiológica não ocorreu ao choque térmico frio uma vez que não se coletou peixes ao longo do mesmo. A ausência de detecção de resposta ao choque térmico frio indica outra possibilidade de que as enzimas relacionadas à síntese de esteroides e glicose foram alteradas durante o choque térmico frio (possivelmente suprimida), ou ainda o período de exposição dos peixes a baixa temperatura da água não foi suficiente para desencadear uma resposta fisiológica a esse estressor.

Estudos futuros devem então determinar se exposições de longa duração do matrinxã a água de baixa temperatura desencadeiam as tradicionais respostas de estresse, já que o conjunto de resultados do presente capítulo sugere uma incapacidade do matrinxã em responder ao frio, que provoca taxas de mortalidade expressivas nas fazendas de piscicultura da região sudeste sul do Brasil.

Embora as respostas primárias e secundárias ao estresse sejam demonstradas em alguns peixes submetidos ao choque térmico frio (Hsieh *et al.*, 2003), uma análise global deve ser considerada, associando-se as condições iniciais anteriores à imposição dos estressores e às características do ambiente, do qual originalmente vem a espécie em questão. O matrinxã é um peixe da bacia amazônica, caracterizada por corpos de águas tépidas e de baixa amplitude térmica durante todo o ano (Goulding, 1980). Nessa região, o choque quente é um estressor naturalmente observado, ao passo que choques frios são essencialmente ausentes. Isso pode ser importante para a justificativa de que essa espécie foi responsiva ao choque térmico quente (de 18°C para 28 °C) e não ao choque frio (de 28°C para 18 °C). Dessa forma, os sistemas biológicos na Amazônia foram ajustados durante os processos evolutivos, para que os organismos tolerassem as mudanças ambientais preferencialmente aos relacionadas a aumentos de temperatura.

Com relação às respostas ao estresse celular, os aumentos na expressão das hsp são comumente observados em peixes de águas frias submetidos ao choque quente, patógenos e exposição a compostos químicos em concentrações próximas às letais (Ackerman *et al.*, 2000; Ackerman & Iwama, 2001; Smith *et al.*, 1999; Vijayan *et al.*, 1998). Entretanto, o uso das hsp como indicadores de estresse em peixes é ainda controverso e prematuro (Iwama *et al.*, 2004). De fato, peixes expostos a estressores como manuseio *handling* (Vijayan *et al.*, 1997), anestesia, captura, jejum prolongado e adensamento não mostraram aumento na expressão das hsp (Zarate & Bradley, 2003). No presente capítulo, o matrinxã não

aumentou significativamente as expressões da hsp-70 em resposta ao estresse térmico, embora os parâmetros plasmáticos de cortisol e glicose indicassem estresse fisiológico. Hightower *et al.* (1999) sugerem que algumas espécies de peixes resistentes a mudanças de temperatura da água podem ter níveis constitutivos mais altos das hsp, associados a maiores graus de respostas dessas proteínas ao estresse térmico. Nossos resultados mostram que o matrinxã possui baixo nível constitutivo das hsp-70 e restrito ainda às brânquias. O matrinxã não foi responsivo em termos da expressão da hsp-70, reforçando-se a necessidade de mais estudos no que concernem às relações dos níveis constitutivos da hsp-70, às condições ambientais originais das espécies e aos graus de resposta das hsp.

Uma vez que o choque térmico frio não causou desnaturação das proteínas citoplasmáticas do matrinxã, mas sim inibição muito provavelmente de outras enzimas celulares (EtcheGARAY & Inouye, 1999), o perfil da resposta da hsp-70 no matrinxã tem sentido. De igual forma, salmão do atlântico (*Salmo salar*), quando exposto a choques térmicos de 16 °C para 4 °C durante 2 h, não apresentou alterações nos níveis do RNAm da hsp-70 (Zarate & Bradley, 2003). Um outro estudo *in vitro*, onde foram utilizadas linhagens de células de um peixe de água tropicais (zebrafish ZF4) e linhagens de células da truta arco-íris (RTG-2) num ensaio de baixa temperatura, foram observados aumentos da hsp-70 somente nas células de truta (Yamashita *et al.*, 1996).

Nesse estudo o matrinxã foi também submetido a um choque quente por ocasião da volta dos peixes às condições iniciais (de 18 °C para 28 °C). Mas mesmo assim não foi observado aumento na expressão da hsp-70. Entretanto, não há outros trabalhos realizados em condições similares as encontradas aqui.

Por outro lado, alguns insetos apresentaram maior indução na expressão da hsp-70 durante o período de recuperação ao choque frio (Burton *et al.*, 1988; Joplin *et al.*, 1990; Nunamaker *et al.*, 1996). Assim os valores de cortisol e glicose plasmática demonstraram a responsividade do matrinxã na volta das condições de água fria (18 °C) para as condições iniciais (28 °C), num perfil de resposta a estímulos adversos repetidos (manuseio + choque quente).

É muito possível também que o perfil da resposta da hsp-70 à volta as condições de temperatura iniciais seja influenciado pela historia natural do matrinxã, que habita as águas amazônicas essencialmente mornas e de baixa amplitude térmica (Esteves, 1988). Elevações significativas nas expressões da hsp-70 têm sido relatada, quando peixes de águas frias são submetidos repentinamente a temperaturas da água 5-10 °C acima de seus intervalos normais de temperatura (Liquidist, 1986). Dessa forma, é possível que o choque quente imposto ao matrinxã não tenha sido suficiente para evidenciar uma resposta em nível celular. De maneira parecida, juvenis de tilapia não evidenciaram resposta da hsp-70 quando submetidas a aumentos de temperatura dentro da faixa considerada normal para a espécie (Basu *et al.*, 2001).

## **5. Conclusão**

Não se pode ainda assegurar que o matrinxã não induza a hsp-70 em resposta ao estresse térmico, embora tenham sido observadas evidentes respostas plasmáticas. Estudos futuros são necessários para investigar o estresse térmico em matrinxã, esclarecendo relação entre os níveis fisiológicos e celulares.

A expressão de outras proteínas pode ainda ter ocorrido no matrxã em resposta ao estresse térmico.

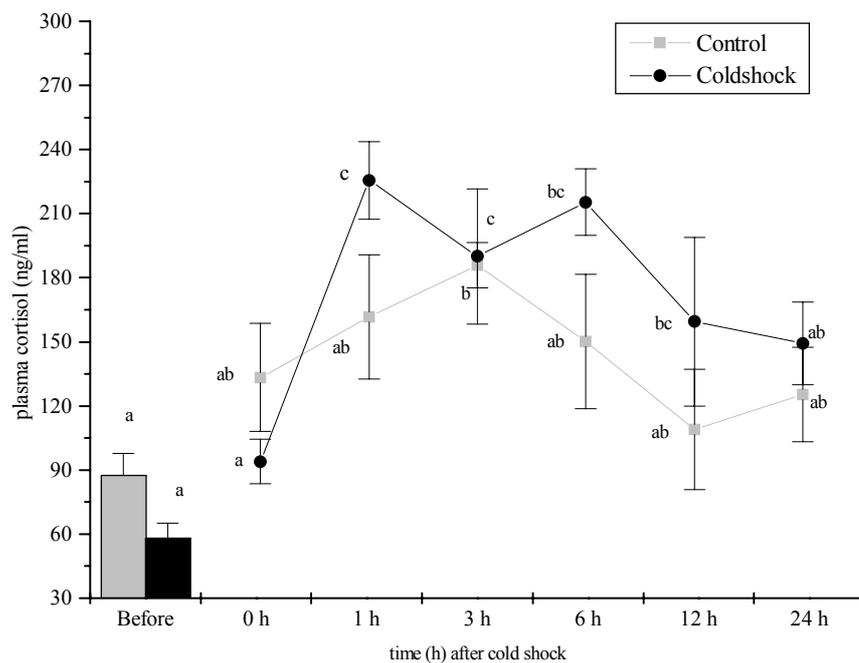


Figura 1. Efeito do choque térmico frio (Cold shock) de 1 h (de 28°C para 18 °C) nos valores de cortisol do matrinxã (*Brycon cephalus*). Peixes do grupo controle foram submetidos ao mesmo manuseio necessário para a condução do choque térmico frio e volta às condições iniciais, porém qualquer variação na temperatura da água foi devidamente evitada. ANOVA, LSD: Cortisol (F = 2.63; P = 0.05).

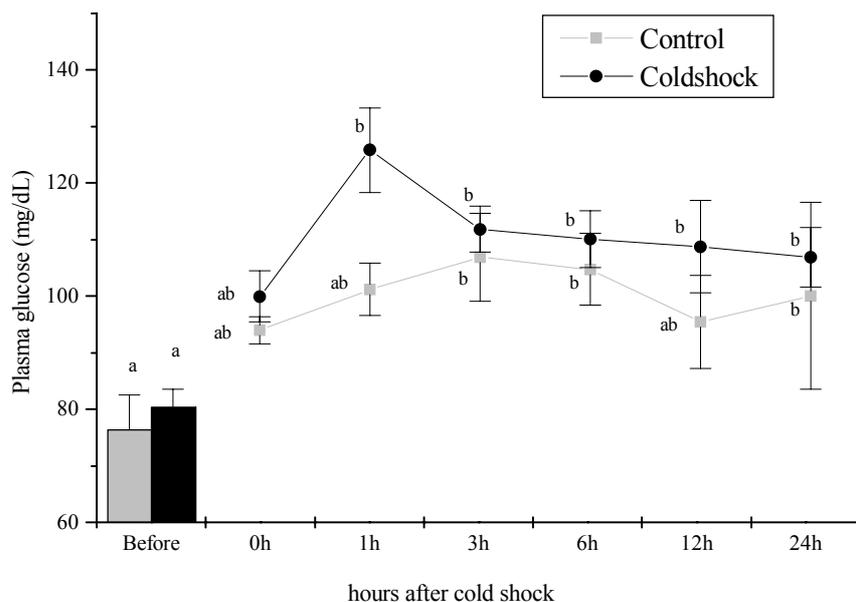


Figura 2. Efeito do choque térmico frio (Cold shock) de 1 h (de 28°C para 18 °C) nos valores de glicose plasmática do matrinxã (*Brycon cephalus*). Peixes do grupo controle foram submetidos ao mesmo manuseio necessário para a condução do choque térmico frio e volta às condições iniciais, porém qualquer variação na temperatura da água foi devidamente evitada. ANOVA, LSD: Glicose (F= 1.74; P= 0.06).

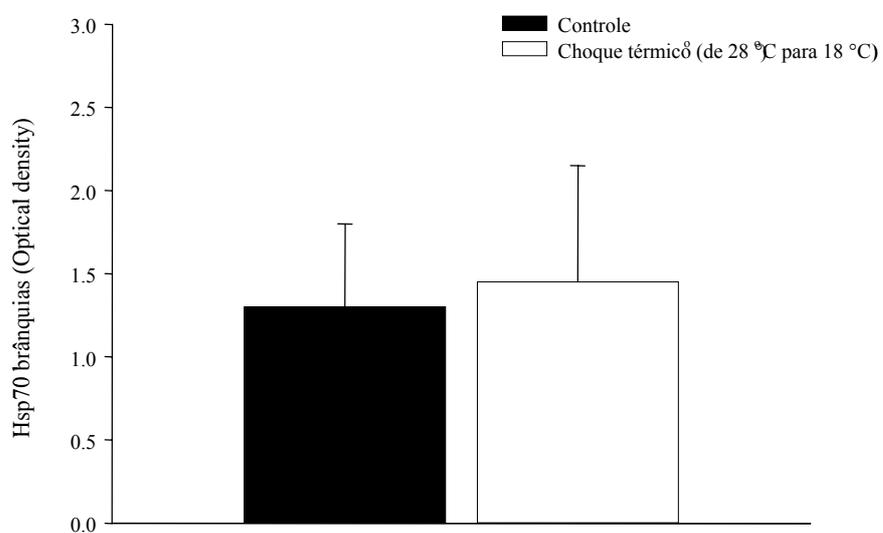


Figura 3. Intensidade de bandas da Hsp 70 em brânquias de matrinxã submetido ao choque térmico de 28°C para 18°C. Grupos controle foram somente submetidos ao manejo necessário para a realização do choque térmico.

## 6. Referências Bibliográficas

- ACKERMAN, P., FORSYTH, R., MAZUR, C., IWAMA, G. Stress hormones and cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, p. 327-336, 2000.
- ACKERMAN, P., IWAMA, G.K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.13, p. 173-180, 2001.
- AVILEZ, I., ALTRAN, A., AGUIAR, L., MORAES, G. Hematological responses of the neotropical teleost matrinxã *Brycon cephalus* to environmental nitrite. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 139 C, n. 1-3, 135-139. 2004.
- BASU, N., NAKANO, T., GRAU, E.G., IWAMA, G.K. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 97-105, 2001.
- BURTON, V., MITCHELL, H. YOUNG, P., PETERSEN, N. Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, p. 3550-3552. 1988.
- CARNEIRO, P.C.F., URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 297-304, 2001.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

- CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; PEREIRA-FILHO, M. Digestibilidade da proteína de origem animal e vegetal pelo matrinxã (*Brycon cephalus* GUNTHER, 1869) (Eusteioi, Characiformes, Characidae) In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA**, 4, 1986, Cuiabá, Anais... Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, Funep, 1986, 49-62.
- DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. **American Journal of Medical Science**, v. 215, n. 1, p. 110-111, 1948.
- ESTEVES, F. **Fundamentos de Limnologia**. Editora Interciência- Finep, Rio de Janeiro, 1988. 575p.
- ETCHEGARAY, J.P., INOUYE, M. CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1827-1830, 1999.
- GOULDING, M. **The fishes and the forest: explorations in Amazonian Natural History**. University of California Press, Berkeley, 1980, 200 p.
- HIGHTOWER, L.E., NORRIS, C.E., DILORIO, P.J., FIELDING, E. Heat shock responses of closely related species of tropical and desert fish. **American Zoology**, v. 39, p. 877-888, 1999.
- HSIEH, S.L., CHEN, Y.N., KUO, C.M. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation. **Aquaculture**, v. 220, p. 903-908, 2003.

- IWAMA, G. AFONSO, L. TODGHAM, A. ACKERMAN, P. NAKANO, K. Are Hsps suitable for indicating stressed states in fish? **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 15-19, 2004.
- JOPLIN, K., YOCUM, G., DENLINGER, D. Cold shocks elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n.11. p. 825-834.1990.
- LAEMMLI, I.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIQUIDST, S. The heat-shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 1151-1191. 1986.
- NUNAMAKER, R., DEAN, V., MURPHY, K., LOCKWOOD, A. Stress protein elicited by cold shock in the biting midge *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth and Jones. **Comparatove Biochemistry and Physiology**, v. 113 B, p. 73-77.1996.
- ROUBACH, R., GOMES, L., VAL, A. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS 222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã *Brycon cephalus*. **Acta amazonica**, v. 31, n. 1, p. 159-163, 2001.
- SMITH, P.K. KROHN, R.I. HERMANSON, G.T. MALLIA, A.K. GARTENR, F.H. PROVENZANO, M.D. FUJIMOTO, E.K. GOEKE, N.M. OLSON, B.J. KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- SMITH, T.R., TREMBLAY, G.C., BRADLEY, T.M. Characterization of the heat shock protein response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiological Biochemistry**, v. 20, p. 279-292, 1999.

- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annalitical Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24-27, 1969.
- URBINATI, E. ABREU, J. CAMARGO, A. PARRA, M. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004.
- VIJAYAN, M.M. PEREIRA, C. FORSYTH, R.B. KENNEDY, C.J. IWAMA, G.K. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation heat shock cognate hsc 71 gene from rainbow trout. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 893-900, 1997.
- VIJAYAN, M.M. PEREIRA, C. KRZYNSKI, G. IWAMA, G.K. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in 2 salmonids. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p. 101-108, 1998.
- YAMASHITA, M., OJIMA, N., SAKAMOTO, T. Induction of protein in response to cold acclimation of rainbow trout cells. **FEBS Letters**, v. 382, p. 261-264. 1996.
- ZARATE, J. BRADLEY, T. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. **Aquaculture** v. 223, p. 175-187, 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho constatou-se que o matrinxã é um bom modelo para os estudos das respostas ao estresse em peixes. Essa espécie apresentou-se bastante responsiva aos diversos estímulos impostos no decorrer dos protocolos experimentais. Por outro lado, confirma-se que o matrinxã é uma espécie bastante sensível ao manuseio usualmente praticado nas fazendas brasileiras, recomendando-se assim que esse seja realmente executado com cautela extrema.

Muitos estímulos adversos a homeostase são cotidianamente impostos aos peixes, que infelizmente na maioria dos casos são inevitáveis por questões operacionais da piscicultura. Os estímulos de estresse térmico são bastante danosos ao matrinxã, que não apresentou respostas fisiológicas e celulares ao choque frio abrupto. Isso pode explicar as elevadas taxas de mortalidade relatadas em condições de campo semelhantes às simuladas no capítulo 6. Dessa forma, caso os peixes tivessem permanecido na água fria a 18 °C por mais tempo, mortalidade seria esperada. Assim, novos trabalhos serão conduzidos, no que concernem à tolerância do matrinxã a abruptas mudanças de temperatura da água, avaliando-se temperaturas letais, faixas de bem estar térmico, bem como a associação com outros estressores relacionados com a piscicultura intensiva, tais como, a despesca e o transporte em condições de água mais fria que as águas encontradas na região de origem do matrinxã, a bacia amazônica.

O manuseio direto de peixes é um estressor agudo para o matrinxã, cujas respostas fisiológicas e bioquímicas foram prontamente detectadas. O uso de anestésicos como o eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol não diminuíram as respostas fisiológicas do estresse durante manuseios de matrinxã, demonstrando que não existe um produto ideal para se manipular peixes. Ou seja, dificilmente encontrar-se-á um produto no mercado que propicie o manuseio do matrinxã, fazendo-se ainda com que os peixes não sintam qualquer conseqüência fisiológica, mesmo que em níveis mínimos.

Logo o uso de anestésicos como o eugenol, a benzocaína e o fenoxietanol é necessário, pois cada um proporciona aos profissionais da área de piscicultura manusear matrinxãs com o risco mínimo de acidentes ao redor de equipamentos cortantes e/ou pontiagudos em conseqüência da movimentação excessiva que os peixes realizam, quando acuados. Além do mais, a imobilização de peixes durante o manejo é muitas vezes necessária para se evitar ferimentos na superfície do corpo dos mesmos, que podem também posteriormente facilitar a manifestação de organismos patogênicos.

O transporte de peixes parece ser a prática de campo mais complexa nas fazendas de produção comercial de peixes, pois associa seqüencialmente diversos estressores (despesca, carregamento, deslocamento, descarregamento e mudança de ambiente) num curto período. O matrinxã apresentou-se também bastante responsivo a essa prática, que deve ainda ser mais estudada para a espécie em questão, avaliando-se as condições iniciais dos peixes, tais como, o estado nutricional dos animais, a infestação crônica por parasitas e a exposição

crônica à baixa qualidade da água de cultivo, anteriormente a imposição de qualquer estressor.

O estudo das alterações nos valores do cortisol plasmático foi a melhor resposta fisiológica detectada no matrinxã, quando submetido aos estímulos estressantes de choque térmico, manuseio e transporte. O desencadeamento das demais respostas de estresse pelo aumento do cortisol plasmático foi também detectado, principalmente através do aumento dos valores de glicose, lactato e amônia do plasma. Além disso, o decréscimo dos valores dos íons plasmáticos de sódio, potássio e cloreto foram também ótimos sinais das respostas secundárias do estresse no matrinxã. As alterações dos valores de proteína plasmática puderam indicar de alguma forma resposta do matrinxã ao estresse, sendo, entretanto, sua aplicabilidade um pouco limitada. Mais estudos das respostas de estresse no matrinxã devem ainda ser implementados, no que tange aos efeitos de vários outros estressores, além dos aqui estudados, nos valores de cortisol plasmático e sua dinâmica e mecanismos de ação na regulação do metabolismo e sistema imune do matrinxã.

De acordo com os nossos levantamentos bibliográficos, o estudo das respostas de estresse do matrinxã, em nível celular, foram aqui investigados pela primeira vez. A detecção do estresse em peixes em nível celular tem sido mais amplamente divulgada através da expressão da hsp-70, que foi detectada no matrinxã somente em seus níveis constitutivos. Outros estressores (exposições de peixes a organismos patogênicos e/ou compostos químicos tóxicos) serão ainda estudados no matrinxã no que concernem às respostas de estresse em nível celular. Outras proteínas de estresse como a hsp-20 e a hsp-90 parecem estar

também associadas ao estresse do matrinxã em nível celular, faltando ainda para isso mais esforços de pesquisas.

Dentro das condições do presente trabalho, confirma-se a responsividade do matrinxã a manipulação direta de peixes vivos adotadas nas fazendas brasileiras, evidenciando-se a necessidade de mais estudos em diferentes campos da biologia de peixes, não somente para fins de aperfeiçoamento do cultivo dessa espécie, mas também para a compreensão de muitos mecanismos biológicos básicos, que envolvem a origem dos peixes tropicais e suas diferentes respostas a fatores estressantes, resultantes de variações ambientais ou impostas pelo homem. O matrinxã como as outras espécies de peixes amazônicos habitam uns dos ecossistemas aquáticos mais complexos do planeta, onde muitos fatores parecem influenciar em suas respostas de estresse, principalmente em se tratando das características naturais da bacia amazônica e sua história evolutiva.

## Anexos

### 1. Solução de Drabkin

- a. KCN
  - b.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - c.  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- Água destilada

### 2. Solução citrato formol

- a. Formoldeído PA
- b. Citrato de sódio

### 3. Reagente para determinação de cloreto

- a. Tiocianato de mercúrio
- b. Etanol
- c. Nitrato de ferro
- d. ácido nítrico
- e. NaCl

### 4. Produção científica

INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Benzocaína como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Boletim Técnico do Cepta**, v. 15, p. 23-30, 2002.

- INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 563-565, 2004.
- INOUE, L.A.K.A., HACKBARTH, A., MORAES, G. Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Biodiversidade Pampeana**, v. 2, p. 10-15, 2004.
- INOUE, L.A.K.A., AFONSO, L., IWAMA, G., MORAES, G. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta amazonica** (enviado em 02 de Outubro de 2004).
- INOUE, L.A.K.A., MORAES, G. Evaluation of the Physiological Responses of the Teleost Matrinxã (*Brycon cephalus*) to Transportation in Plastic Bags. **Journal of Applied Aquaculture** (enviado em 9 de Novembro de 2004).
- INOUE, L.A.K.A., MORAES, G., IWAMA, G., AFONSO, L. Physiological stress response in the warm-water fish matrinxã (*Brycon cephalus*) exposed to a sudden cold shock. **Aquaculture** (enviado em 03 de Dezembro de 2004).
- INOUE, L.A.K.A., MORAES, G. Eugenol as anesthetic for biometry of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) (artigo em elaboração).
- INOUE, L.A.K.A., BOIJINK, C., RANTIN, F.T., MORAES, G. Respostas cardio-respiratórias do matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) submetido aos anestésicos eugenol, benzocaína e 2-phenoxyethanol (artigo em elaboração).