



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

THIAGO GIL DOS SANTOS

**MARCAÇÃO QUÍMICA DE PIRACANJUBA *BRYCON ORBIGNYANUS*
COM ALIZARINA VERMELHA**

FLORIANÓPOLIS-SC

2020

Thiago Gil dos Santos

**MARCAÇÃO QUÍMICA DE PIRACANJUBA *BRYCON ORBIGNYANUS*
COM ALIZARINA VERMELHA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção de título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho

Florianópolis-SC

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Thiago Gil dos
Marcação química de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* com
alizarina vermelha / Thiago Gil dos Santos ; orientador,
Evoy Zaniboni Filho, 2020.
30 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Marcação maciça. 3. Escama. 4. Raios
de nadadeira. 5. Estruturas calcificadas. I. Zaniboni
Filho, Evoy . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Thiago Gil dos Santos

Marcação química de piracanjuba *Brycon orbignyanus* com alizarina vermelha

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Renata Maria Guerreschi, Dra.
Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce - LAPAD

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Profª. Dra. Leila Hayashi
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho
Orientador

Florianópolis, 28 de novembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por seu apoio e amor incondicional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Ao professor Dr. Evoy Zaniboni Filho pelo exemplo profissional e humano e por aceitar ser meu orientador.

A toda a equipe do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce – LAPAD/UFSC que contribuiu para realização desta etapa de formação profissional.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME/UFSC pela orientação e ajuda na obtenção das imagens.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Carlito chefe de expediente do Programa de Pós Graduação em Aquicultura por toda orientação e acolhimento em momentos necessários.

Ao Estado brasileiro por assegurar o direito de acesso a uma educação pública e de qualidade.

A Deus, senhor de todas as coisas.

RESUMO

Foram testadas diferentes concentrações de Alizarina Vermelha Sódica (ARS) e distintos períodos de duração do banho de imersão para marcação química de juvenis de Piracanjuba *Brycon orbignyianus*. Utilizou-se 120 animais distribuídos em dez tratamentos e dois grupos controle. Foram testados procedimentos de marcação de curta (5 minutos) e média duração (4h) com e sem a indução osmótica prévia ao banho de imersão. Essa indução osmótica consistiu na imersão dos animais em solução salina (30 g de NaCl/L) por 10 minutos, sendo imediatamente transferidos para tanque contendo a solução de ARS a ser testada. Nos testes de longa duração (18h) não foi testada a indução osmótica prévia. A concentração de ARS testada variou de acordo com o tempo de exposição ao produto: a) curta duração (500 mg/L e 150 mg/L); b) média duração (150 mg/L e 50 mg/L); c) longa duração (50 mg/L; 15 mg/L). A avaliação da eficiência da marcação química foi realizada 10 dias após a realização dos banhos imersão com alizarina e grupos controle. Para isso, foram retirados aleatoriamente três indivíduos de cada tratamento, dos quais foram removidas amostras de quatro estruturas de cada um deles (raios das nadadeiras caudal, anal e peitoral, além de escamas). A verificação da presença das marcas e geração das imagens correspondentes se deu a partir da utilização de microscópio de fluorescência Leica Microsystems LAS AF Lite. A avaliação da intensidade de fluorescência foi realizada com o programa imageJ em valores de cinza (CV). Os juvenis de Piracanjuba toleraram bem aos tratamentos a que foram submetidos, sem apresentar mortalidade. A indução osmótica induziu a autofluorescência e não aumentou a intensidade da marcação química na Piracanjuba. Sem a influência da indução osmótica prévia, foi encontrada a concentração efetiva para a marcação química de juvenis de Piracanjuba em banhos de curta, média e longa duração. Foram obtidas marcações químicas com intensidade semelhante em tratamento feito com apenas 5 minutos de exposição da Piracanjuba ao produto (150mg ARS/L), ou ainda, utilizando apenas 10% dessa quantidade quando a exposição foi prolongada por 18 horas. Tanto as escamas quanto os raios de nadadeiras apresentaram marcação química pela exposição à alizarina vermelha na Piracanjuba, porém, os raios das nadadeiras apresentaram a maior intensidade de fluorescência. A Alizarina Vermelha se mostrou eficiente na marcação química de juvenis de *Brycon orbignyianus*.

Palavras chave: Aquicultura. Marcação maciça. Escama. Raios de nadadeira. Estruturas calcificadas.

ABSTRACT

Different concentrations of Alizarin Red Sodium (ARS) and different time of immersion bath were tested for chemical marking of Piracanjuba *Brycon orbignyanus* juveniles. One hundred and twenty animals were distributed in ten treatments and two control groups. Short time (5 minutes) and medium time of immersion bath (4h) marking procedures were tested with and without osmotic induction before the immersion bath. This osmotic induction consisted of immersing the animals in saline solution (30 g of NaCl / L) for 10 minutes, and immediately transferred to a tank containing the ARS solution to be tested. In long-term tests (18h) previous osmotic induction was not tested. The tested ARS concentration varied according to the time of exposure to the product: a) short time (500 mg / L and 150 mg / L); b) medium time (150 mg / L and 50 mg / L); c) long-term (50 mg / L; 15 mg / L). The chemical marking efficiency was evaluated 10 days after the immersion baths. For this purpose, three individuals were randomly taken from each treatment, from which samples were removed from four different structures of each one (caudal, anal and pectoral fin rays, as well as scales). The presence of the marks and generation of the corresponding images was made by using a Leica Microsystems LAS AF Lite fluorescence microscope. The fluorescence intensity was evaluated using the imageJ program in gray values (CV). The juveniles of Piracanjuba tolerated well the treatments to which they were submitted without presenting mortality. Osmotic induction treatment induced autofluorescence and did not increase the intensity of chemical marking in Piracanjuba. Without the influence of previous osmotic induction, it was found the effective concentration for chemical marking of Piracanjuba juveniles in short, medium and long time duration baths. Similar intensity of chemical markings were obtained in a treatment made with Piracanjuba's 5 minutes exposure to the product (150mg ARS / L), or using only 10% of this amount when the exposure time is prolonged for 18 hours. Both scales and fins rays were chemically marked by exposure to red alizarin in Piracanjuba, but fins rays showed the highest fluorescence intensity. Red Alizarin proved to be efficient in chemical marking of *Brycon orbignyanus* juveniles.

Keywords: Aquaculture. Massmarking. Scale. Fins rays. Calcified structures.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Pré-teste de indução osmótica com juvenis de Piracanjuba *B. orbignyanus*. 14
- Figura 2** – Intensidade de fluorescência medida em valores de cinza (CV) (medianas, quartis e amplitude de variação) obtidas para os grupos controle e tratamentos precedidos pela indução osmótica. Tratamentos acompanhados de uma mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 23
- Figura 3** – Intensidade de fluorescência medida em valores de cinza (CV) (medianas, quartis e amplitude de variação) obtidas para os grupos controle e tratamentos não precedidos pela indução osmótica. Tratamentos acompanhados de uma mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 24
- Figura 4** – Intensidade de fluorescência medida em valores de cinza (CV) (medianas, quartis e amplitude de variação) obtidas nas estruturas corpóreas (raios de nadadeiras ou escama) dos exemplares de Piracanjuba (raios das nadadeiras anal, caudal, peitoral e escama) dos tratamentos que não foram submetidos a indução osmótica prévia. Tratamentos acompanhadas de uma mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detalhes dos tratamentos de marcação química com alizarina vermelha (ARS) utilizados para os juvenis de Piracanjuba, com variação da concentração, do tempo de exposição e da aplicação ou não de indução osmótica prévia.	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARS - Alizarina Vermelha Sódica

CV - Valores de Cinza

LAPAD - Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

PB - Proteína Bruta

EUA - Estados Unidos da América

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1.1	Estocagem como ação mitigadora de impactos dos reservatórios de hidrelétrica	11
1.1.2	Marcação de peixes.....	12
1.1.3	Marcação química	13
1.1.4	Piracanjuba – <i>Brycon orbignyana</i>	14
1.2	OBJETIVOS	15
1.2.1	Objetivo geral.....	15
1.2.2	Objetivos específicos.....	15
2	ARTIGO CIENTÍFICO: MARCAÇÃO QUÍMICA DE PIRACANJUBA <i>Brycon Orbignyana</i> COM ALIZARINA VERMELHA	16
2.1	INTRODUÇÃO	17
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1	Procedimentos experimentais	19
2.2.2	Análise da marcação nas estruturas calcificadas.....	21
2.2.3	Análise estatística.....	22
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
2.4	CONCLUSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO REFERENCIAL TEÓRICO	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Estocagem como ação mitigadora de impactos dos reservatórios de hidrelétrica

As hidrelétricas são fontes renováveis de energia e são hoje amplamente utilizadas no mundo para a produção de energia elétrica. O crescimento da demanda de energia elétrica decorre do crescimento populacional associado ao aumento do acesso da população a novas tecnologias, assim como na modernização dos parques industriais. Os grandes reservatórios hidrelétricos tiveram então suas construções estimuladas para atender a esta crescente demanda (AGOSTINHO et al. 2007).

Esses empreendimentos foram projetados com foco na capacidade máxima de geração de energia, tendo subestimados os aspectos ambientais e ecológicos decorrentes de sua implantação e operação. As regiões Sul e Sudeste do Brasil foram as primeiras a receber estes empreendimentos, e em consequência estas regiões são hoje as mais impactadas em seus recursos pesqueiros. As populações de peixes selvagens, sobretudo de espécies migradoras, são fortemente impactadas pelos barramentos. Com objetivo de mitigar os impactos sofridos por estas espécies, em atendimento a legislação nacional, ações de estocagem têm sido empregadas como medida de mitigação dos impactos exercidos sobre estas populações.

Ações de estocagem constituem, portanto, ferramenta de ampla utilização na gestão de recursos pesqueiros impactados. Estas ações são classificadas de acordo com suas finalidades e objetivos (AGOSTINHO et al. 2007), e podem ser de Introdução: quando visam o estabelecimento de espécies não-nativas autossustentáveis; Manutenção: constituídas de solturas frequentes com finalidade de manter estoques de espécies que não se reproduzem no corpo de água receptor; Suplementação: que visa aumentar a população de determinada espécie ou sua variabilidade genética. Essa é considerada a estratégia mais utilizada no Brasil para a mitigação de impacto, sendo estimado que centenas de milhares de peixes tenham sido estocadas no país nas últimas quatro décadas (BARROCA et al. 2015). Apesar desse enorme esforço, poucos estudos foram conduzidos para avaliar o sucesso dessa ação (VIEIRA and POMPEU, 2001; AGOSTINHO et al., 2010).

ARAKI and SCHMID (2010) sugerem que ações de estocagem parecem não ter efeitos positivos sobre as populações selvagens. A ausência de objetivos claros e seu emprego

de forma indiscriminada contribuíram para o insucesso destas iniciativas. Além do mais, a carência de avaliação continuada dos resultados dessas ações constituem um agravante.

A identificação da diferença entre animais estocados e selvagens é fundamental para avaliação do sucesso destas ações (BARROCA et al. 2015; BAUMGARTNER 2016). Sem este diagnóstico não é possível aferir os resultados efetivos dos benefícios ou não da utilização das estocagens como ferramenta de mitigação dos impactos causados à ictiofauna. Apenas desta forma é possível estabelecer uma relação de causa e efeito entre as ações de estocagem e os resultados obtidos (BAUMGARTNER 2016). A avaliação contínua dos resultados permite que se defina, em bases seguras, quando uma ação de estocagem é ou não recomendada além de dar subsídio para o correto planejamento destes programas.

A marcação massiva de peixes neste contexto torna-se necessária para a fundamentação dos resultados obtidos. Vários tipos de marcas têm sido utilizados em programas de estocagem de peixes (NIELSEN 1992), sendo necessário que essas marcas causem pequeno impacto sobre os peixes e apresentem custo reduzido (NANDOR et al., 2010).

1.1.2 Marcação de peixes

Várias técnicas de marcação de peixes foram desenvolvidas para atender às demandas dos estudos e da produção de peixes. Grande parte delas é física e requer a manipulação individual dos peixes a serem marcados (FIELDER, 2002; LEAL et al., 2012), condição que requer mão de obra intensa, é de alto custo e ainda causa estresse aos peixes manipulados. Entre os marcadores físicos é comum o uso de Tags (PIT, DART) e da VIFE (Implante Visual Fluorescente de Elastômero) e entre os marcadores químicos destacam-se a calceína, o estrôncio, lantanídeos, oxitetraciclina e alizarina vermelha, todos disponíveis atualmente no mercado (ABREU et al. 2014).

Os processos de marcação química de peixes oferecem uma série de vantagens em relação aos marcadores físicos, como listado por BASHEY (2004): possibilidade de marcação de número expressivo de indivíduos em um único procedimento; exige um menor manejo e com isso reduz o estresse dos peixes marcados; redução de custos; não promovem alterações na morfologia, aparência ou comportamento dos animais marcados, condição observada nas marcas físicas e que podem induzir predação adicional; resultam marcas passíveis de detecção em longos períodos de tempo; apresentam melhores taxas de sobrevivência após realização do procedimento.

1.1.3 Marcação química

O procedimento de marcação química de peixes consiste na exposição dos animais a substâncias marcadoras. Estes marcadores são impregnados nas estruturas e tecidos calcificados produzindo marcas que podem ser visualizadas. Diversas substâncias fluorescentes tem sido utilizadas nos processos de marcação. Estas substâncias, quando irradiadas por uma fonte de luz absorvem energia emitindo radiação visível (FIELDER 2002).

A marcação pode ser feita através de injeção ou a partir de banhos de imersão (LAGARDERE et al. 2000) onde o corante fluorescente é absorvido a partir da pele e brânquias dos peixes, sendo depositado em estruturas ósseas como otólitos, escamas e raios de nadadeiras que, quando expostas à luz ultravioleta apresentam marcas fluorescentes.

A Alizarina Vermelha (1,2-di-hidroxi-antraquinona) (ARS) é um composto orgânico derivado de raízes de plantas da espécie *Rubia tinctorium*. Com pigmentos avermelhados, foi utilizada inicialmente pela indústria têxtil, e passou a ser fabricada sinteticamente a partir de 1869 (MOUCHREK FILHO et al 1999). Sua utilização como corante na marcação química de peixes apresenta aspectos positivos como custo reduzido, produção de marcas de boa visibilidade e duração estendida (NAGIEC et al. 1995; BECKMAN and SCHULTZ 1996; ECKMAN et al. 1998; LAGARDERE et al. 2000).

NAGIEC et al. (1995) obtiveram sucesso na visualização da marcação química de peixes até 842 dias após tratamento em condições de laboratório e de 128 dias em animais recapturados em campo ao trabalhar com juvenis de *Odontesthes bonariensis* e utilizando Alizarina Vermelha como substância marcadora.

O procedimento de marcação pode ser otimizado a partir do emprego da técnica de indução osmótica, onde os animais são submetidos a imersão de curta duração em solução salina com posterior transferência para a solução com o corante de marcação. Ao expor os peixes a uma solução de alta salinidade, o gradiente osmótico é alterado com perda de água do indivíduo para o meio. Com o retorno para solução de salinidade zero contendo o corante, o gradiente osmótico é novamente alterado com absorção de água do meio pelo indivíduo. Esta técnica permite a otimização do processo de captura e deposição do corante nos tecido ósseos, diminuindo o tempo de exposição ao corante em comparação com o método tradicional (TSUKAMOTO 1985; BECKMAN and SCHULTZ 1996; VAN DER WALT and FARAGHER 2003).

Figura 01: Pré-teste de indução osmótica com juvenis de Piracanjuba *B. orbignyanus*



Fonte: Thiago Gil dos Santos

A indução osmótica resulta em marcas mais visíveis e pode ser avaliada a partir de tecidos ósseos externos como escamas e nadadeiras o que viabiliza uma técnica não-letal de avaliação da presença e qualidade da marcação (MOHLER 2003; CROOK et al. 2007).

1.1.4 Piracanjuba – *Brycon orbignyanus*

O nome do gênero *Brycon*, descende etimologicamente da palavra grega *brycho*, que significa morder ou devorar com certo barulho, enquanto que o nome comum Piracanjuba vem do tupi: *pirá*: peixe, *akanga*: cabeça, *îuba*: amarela, que quer dizer “peixe de cabeça amarela” (GODOY 1975). São animais de grande porte, de corpo alongado (CECCARELLI et al. 2010).

A espécie está distribuída nas bacias dos rios Paraná e Uruguai, e nos países Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (AGOSTINHO et al. 2010). É um peixe reofílico, que migra por longas distâncias para se reproduzir, com o período reprodutivo compreendido entre setembro e janeiro (AGOSTINHO et al. 2010).

Atualmente a Piracanjuba encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção com drástica redução dos estoques principalmente em decorrência do represamento de rios para a construção e operacionalização de usinas hidrelétricas, além da destruição das matas ciliares, poluição, diminuição das lagoas marginais e pesca predatória.

Em virtude de sua importância ecológica, econômica e social, programas de estocagem têm sido utilizados pelas concessionárias do setor elétrico para esta espécie.

Testes preliminares realizados no Laboratório de Biologia e Cultivo de Espécies de Água Doce – LAPAD/UFSC para marcação química da Piracanjuba demonstraram que esta espécie apresenta grande sensibilidade ao manejo e responde de forma negativa quando

submetida a protocolos não específicos. Desta forma faz-se necessário novas pesquisas que estabeleçam um protocolo eficiente e seguro para marcação da espécie. O presente trabalho se dedica a este objetivo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Definir os procedimentos de marcação química com Alizarina Vermelha (ARS) para a Piracanjuba *B. orbignyanus*.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar protocolos de marcação química com ARS em banhos de imersão de curta, média e longa duração para Piracanjuba *B. orbignyanus*.
- b) Avaliar o efeito da indução osmótica prévia no processo de marcação química com ARS para a espécie

2 ARTIGO CIENTÍFICO: MARCAÇÃO QUÍMICA DE PIRACANJUBA *Brycon orbignyana* COM ALIZARINA VERMELHA

ABSTRACT

Different concentrations of Alizarin Red Sodium (ARS) and different time of immersion bath were tested for chemical marking of Piracanjuba *Brycon orbignyana* juveniles. One hundred and twenty animals were distributed in ten treatments and two control groups. Short time (5 minutes) and medium time of immersion bath (4h) marking procedures were tested with and without osmotic induction before the immersion bath. This osmotic induction consisted of immersing the animals in saline solution (30 g of NaCl / L) for 10 minutes, and immediately transferred to a tank containing the ARS solution to be tested. In long-term tests (18h) previous osmotic induction was not tested. The tested ARS concentration varied according to the time of exposure to the product: a) short time (500 mg / L and 150 mg / L); b) medium time (150 mg / L and 50 mg / L); c) long-term (50 mg / L; 15 mg / L). The chemical marking efficiency was evaluated 10 days after the immersion baths. For this purpose, three individuals were randomly taken from each treatment, from which samples were removed from four different structures of each one (caudal, anal and pectoral fin rays, as well as scales). The presence of the marks and generation of the corresponding images was made by using a Leica Microsystems LAS AF Lite fluorescence microscope. The fluorescence intensity was evaluated using the imageJ program in gray values (CV). The juveniles of Piracanjuba tolerated well the treatments to which they were submitted without presenting mortality. Osmotic induction treatment induced autofluorescence and did not increase the intensity of chemical marking in Piracanjuba. Without the influence of previous osmotic induction, it was found the effective concentration for chemical marking of Piracanjuba juveniles in short, medium and long time duration baths. Similar intensity of chemical markings were obtained in a treatment made with Piracanjuba's 5 minutes exposure to the product (150mg ARS / L), or using only 10% of this amount when the exposure time is prolonged for 18 hours. Both scales and fins rays were chemically marked by exposure to red alizarin in Piracanjuba, but fins rays showed the highest fluorescence intensity. Red Alizarin proved to be efficient in chemical marking of *Brycon orbignyana* juveniles.

Keywords: Massmarking. Scale. Fins rays. Calcified structures.

RESUMO

Diferentes concentrações de Alizarina Vermelha Sódica (ARS) e distintos períodos de duração do banho de imersão para marcação química de juvenis de Piracanjuba *Brycon orbignyana*. Utilizou-se 120 animais (n=120) distribuídos em dez tratamentos e dois grupos controle. Foram testados procedimentos de marcação de curta (5 minutos) e média duração (4h) com e sem a indução osmótica prévia ao banho de imersão. A indução osmótica consistiu na imersão dos animais em solução salina (30 g de NaCl/L) por 10 minutos, sendo imediatamente transferidos para tanque contendo a solução de ARS a ser testada. Nos testes de longa duração (18h) não foi testada a indução osmótica prévia. A concentração de ARS testada variou de acordo com o tempo de exposição ao produto: a) curta duração (500 mg/L e 150 mg/L); b) média duração (150 mg/L e 50 mg/L); c) longa duração (50 mg/L; 15 mg/L). A avaliação da eficiência da marcação química foi realizada 10 dias após a realização dos banhos imersão com alizarina e grupos controle. Para isso, foram retirados aleatoriamente três indivíduos de cada tratamento, dos quais foram removidas amostras de quatro estruturas de

cada um deles (raios das nadadeiras caudal, anal e peitoral, além de escamas). A verificação da presença das marcas e geração das imagens correspondentes se deu a partir da utilização de microscópio de fluorescência Leica Microsystems LAS AF Lite. A avaliação da intensidade de fluorescência foi realizada com o programa imageJ em valores de cinza (CV). Os juvenis de Piracanjuba toleraram bem os tratamentos a que foram submetidos sem apresentar mortalidade. A indução osmótica induziu a autofluorescência e não aumentou a intensidade da marcação química na Piracanjuba. Sem a influência da indução osmótica prévia, foi encontrada a concentração efetiva para a marcação química de juvenis de Piracanjuba em banhos de curta, média e longa duração. Foram obtidas marcações químicas com intensidade semelhante em tratamento feito com apenas 5 minutos de exposição da Piracanjuba ao produto (150mg ARS/L), ou ainda, utilizando apenas 10% dessa quantidade quando a exposição foi prolongada por 18 horas. Tanto as escamas quanto os raios de nadadeiras apresentaram marcação química pela exposição à alizarina vermelha na Piracanjuba, porém, os raios das nadadeiras apresentaram maior intensidade de fluorescência. A Alizarina Vermelha se mostrou eficiente na marcação química de juvenis de *Brycon orbignyanus*.

Palavras chave: Marcação maciça. Escama. Raios de nadadeira. Estruturas calcificadas.

2.1 INTRODUÇÃO

Várias técnicas de marcação de peixes foram desenvolvidas para atender às demandas dos estudos e da produção de peixes. Grande parte delas é física e requer a manipulação individual dos peixes a serem marcados (FIELDER, 2002; LEAL et al., 2012), condição que requer mão de obra intensa, é de alto custo e ainda causa estresse aos peixes manipulados. A marcação química de estruturas ósseas de peixes tem sido utilizada para a marcação simultânea de grande número de peixes, sendo uma alternativa para contornar a problemática dos métodos de marcação que envolve a manipulação individual (ABREU et al. 2014). Existem diferentes substâncias que têm sido utilizadas como marcador químico em peixes, entre elas: calceína, estrôncio, lantanídeos, oxitetraciclina e alizarina vermelha.

Os processos de marcação química de peixes oferecem uma série de vantagens em relação aos marcadores físicos, como listado por BASHEY (2004): possibilidade de marcação de número expressivo de indivíduos em um único procedimento; exige um menor manejo e com isso reduz o estresse dos peixes marcados; redução de custos; não promovem alterações na morfologia, aparência ou comportamento dos animais marcados, condição observada nas marcas físicas e que podem induzir predação adicional; resultam marcas passíveis de detecção em longos períodos de tempo; apresentam melhores taxas de sobrevivência após realização do procedimento.

A Alizarina Vermelha (ARS) (1,2-di-hidroxi-antraquinona) é um composto orgânico derivado de raízes de plantas da espécie *Rubia tinctorium* L. que apresenta pigmentos

avermelhados e foi utilizada inicialmente pela indústria têxtil, quando passou a ser produzida sinteticamente, a partir de 1869 (MOUCHREK FILHO et al 1999). Sua utilização como corante na marcação química de peixes apresenta aspectos positivos como custo reduzido, produção de marcas de boa visibilidade e longa duração (NAGIEC et al. 1995; BECKMAN and SCHULTZ 1996; ECKMAN et al. 1998; LAGARDERE et al. 2000).

A marcação química pode ser feita através de injeção ou a partir de banhos de imersão (LAGARDERE et al. 2000). No segundo caso, o corante dissolvido na solução é absorvido a partir da pele e do tecido branquial dos peixes, sendo depositado em estruturas ósseas, tais como otólitos, escamas e raios de nadadeiras. Essas estruturas impregnadas pelo corante apresentam fluorescência quando expostas à luz ultravioleta, revelando marcas passíveis de visualização.

O procedimento de marcação química pode ser otimizado a partir do emprego da técnica de indução osmótica (TSUKAMOTO 1985; BECKMAN and SCHULTZ 1996; VAN DER WALT and FARAGHER 2003), na qual os animais são submetidos a imersão de curta duração em solução salina com posterior transferência para a solução contendo o corante de marcação. Ao expor os peixes a uma solução de alta salinidade, o gradiente osmótico é alterado com perda de água do indivíduo para o meio. Ao retornar os peixes para solução contendo o corante e sem salinidade, o gradiente osmótico é novamente alterado favorecendo a absorção de água e corante do meio pelo indivíduo, condição que maximiza a absorção do marcador químico. A indução osmótica resulta em marcas mais visíveis e que podem ser avaliadas a partir de tecidos ósseos externos, tais como escamas e raios de nadadeiras, o que viabiliza uma técnica não-letal de avaliação da presença e qualidade da marcação (MOHLER 2003; CROOK et al. 2007).

A Piracanjuba é uma espécie de peixe que sofreu drástica redução dos estoques nas últimas décadas, estando atualmente listada no Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (MACHADO et al. 2008). A espécie se encontra ameaçada por uma combinação de quatro fatores: destruição das matas ciliares, represamento dos rios, poluição aquática e introdução de espécies (AGOSTINHO et al. 2008).

Em virtude da importância ecológica, econômica e social da manutenção dos estoques de peixes, programas de estocagens e repovoamentos têm sido utilizados pelas concessionárias do setor elétrico desde a segunda metade do século XX. Apesar disso, alguns autores sugerem que ações de estocagem parecem não ter efeitos positivos sobre as populações selvagens (ARAKI and SCHMID, 2010). Nos muitos dos casos em que não houve uma avaliação criteriosa dessa ação de estocagem o insucesso foi percebido apenas anos ou

décadas mais tarde. Segundo BAUMGARTNER (2016), a identificação da diferença entre animais estocados e selvagens é fundamental para avaliação do sucesso destas ações. Sem este diagnóstico não é possível aferir os resultados efetivos dos benefícios ou não da utilização das estocagens como ferramenta de mitigação dos impactos causados à ictiofauna. Apenas desta forma é possível estabelecer uma relação de causa e efeito entre as ações de estocagem e os resultados obtidos.

A marcação massiva de peixes neste contexto torna-se necessária para a fundamentação dos resultados obtidos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Procedimentos experimentais

A experimentação foi realizada em fase única no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) vinculado ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os juvenis de Piracanjuba selecionados para este estudo são provenientes de reprodução induzida de indivíduos originários da bacia do rio Paraná e adquiridos de uma piscicultura comercial da região. Foram utilizados 120 juvenis de 120 ± 35 g e 20 ± 12 cm com oito meses de idade.

Foram testados procedimentos de marcação com e sem a indução osmótica prévia ao banho de imersão em solução contendo diferentes concentrações de alizarina vermelha (ARS), mantidos em período de curta duração (5 minutos) e média duração (4h). Os testes de longa duração (18h) foram conduzidos sem indução osmótica. De acordo com FLETCHER (2018), a indução osmótica em banhos de longa duração com ARS aumenta a mortalidade dos peixes após o tratamento.

Os tempos e concentrações para os procedimentos de indução osmótica foram determinados a partir de pré-testes realizados com a Piracanjuba, sendo tomado por base os resultados compilados em revisão realizada por FLETCHER (2018) e resultados obtidos por HERMES-SILVA et al. (2015). O procedimento utilizado para a indução osmótica foi a prévia imersão dos animais por 10 minutos em solução de 30 g de NaCl/L, sendo imediatamente transferidos para a solução teste.

A experimentação foi realizada em dois blocos. O primeiro experimento testou os procedimentos de marcação química precedidos de indução osmótica. Foi composto por 04

tratamentos e um grupo controle (n=50). O segundo experimento testou os procedimentos de marcação sem prévia realização dos banhos de indução osmótica. Foi composto por 06 tratamentos e um grupo controle (n=70).

A experimentação em dois blocos portanto foi composta por 10 tratamentos e 2 grupos controle. Cada unidade experimental continha 10 animais (n = 120) que foram distribuídos de forma a manter uma biomassa semelhante entre elas.

Os banhos de imersão em solução marcadora foram realizados em recipientes de 80L.

A concentração de ARS testada variou inversamente com o tempo de exposição ao produto: a) curta duração (500 mg/L e 150 mg/L); b) média duração (150 mg/L e 50 mg/L); c) longa duração (50 mg/L; 15 mg/L) (Tabela 1).

Tabela 1 – Tratamentos de marcação química com alizarina vermelha (ARS) utilizados para os juvenis de Piracanjuba, com variação da concentração, do tempo de exposição e da aplicação ou não de indução osmótica prévia.

Experimento 01: Com indução osmótica prévia (imersão em solução contendo 30 g/L de NaCl por 10 minutos)	
Ctrl-CI	Grupo controle com indução osmótica
T-1	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 500mg/L (ARS)
T-2	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 150 mg/L (ARS)
T-3	Banho Médio de 4 horas (BM) – 150 mg/L (ARS)
T-4	Banho Médio de 4 horas (BM) – 50 mg/L (ARS)
Experimento 02: Sem indução osmótica prévia	
Ctrl-SI	Grupo controle sem indução osmótica
T-5	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 500 mg/L (ARS)
T-6	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 150 mg/L (ARS)
T-7	Banho Médio de 4 horas (BM) – 150 mg/L (ARS)
T-8	Banho Médio de 4 horas (BM) – 50 mg/L (ARS)
T-9	Banho Longo de 18 horas (BL) – 50 mg/L (ARS)
T-10	Banho Longo de 18 horas (BL) – 15 mg/L (ARS)

Após a realização dos banhos de imersão testados, os animais passaram por banho de higienização, para remoção de resíduos da solução que poderia estar aderida aos peixes, e foram transferidos para recipientes de 1000L abastecidos por um mesmo sistema de recirculação de água. Os animais de cada tratamento, estocados em tanque-rede com volume de 80L, foram acomodados nas unidades de 1000L (04 tanques rede de 80L em cada unidade de 1000L). Foram utilizadas três recipientes de 1000L, onde foram aleatoriamente acomodados os animais originários dos distintos tratamentos, sendo mantida biomassa semelhante entre elas. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia até saciedade aparente com ração comercial contendo 42 % de proteína bruta (PB).

Decorridos 10 dias após o tratamento de marcação, três indivíduos de cada tratamento e grupos controle foram anestesiados com produto comercial Eugenol (óleo de cravo) em solução contendo 50 mg/L. Após a anestesia foram removidas quatro estruturas distintas: raios das nadadeiras caudal, anal, peitoral e escamas. Não houve mortalidade após o tratamento de marcação e nem decorrente da amostragem das estruturas para análise.

A qualidade da água do sistema de recirculação foi monitorada diariamente por meio do medidor multiparâmetro YSI *Professional Plus*. Os parâmetros de qualidade de água foram mantidos dentro da faixa de exigência da espécie e com valores semelhantes nas distintas unidades experimentais, com valores médios (\pm desvio padrão) do oxigênio dissolvido ($7,4 \pm 0,14$ mg/L), pH ($7,31 \pm 0,83$) e temperatura ($23,5 \pm 0,71^\circ\text{C}$). Durante a realização dos banhos de imersão, a temperatura da água foi mantida em 24°C . As concentrações de amônia total e de nitrito foram determinadas uma vez por semana em um fotolorímetro AT 10P e não ultrapassaram 1,5 mg/L e 1,0 mg/L, respectivamente.

2.2.2 Análise da marcação nas estruturas calcificadas

A confecção das lâminas seguiu o protocolo estabelecido por ABREU et al (2014). A verificação da presença das marcas e geração das imagens correspondentes foi realizada com a utilização de microscópio de fluorescência Leica Microsystems LAS AF Lite. Tanto a disponibilidade do equipamento quanto a supervisão técnica para sua utilização foi do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC). As fotografias foram obtidas usando o software LEICA LAS AF lite.

Para avaliação de intensidade de fluorescência foi utilizado o programa ImageJ. Um programa desenvolvido no National Institutes of Health (E.U.A), de domínio público, feito em linguagem Java e destinado a processamento de imagens. As imagens foram convertidas ao formato JPG compatível com o programa. O programa permite a avaliação da intensidade de fluorescência de uma dada imagem em sua totalidade ou em área determinada pelo usuário. A avaliação da imagem é expressa em valores de cinza (CV).

Para avaliação da intensidade desta emissão de luz (fluorescência) o programa converte a luz emitida pelas substâncias fluorescentes após irradiação de luz U.V. em uma escala que vai da cor branca a cor preta em 256 categorias com início no valor zero (branco) e final no valor 255 (preto). Cada um destes 256 intervalos (0 – 255) constitui a unidade de medida valores de cinza (CV) para imagens configuradas em 8-bit. Para avaliação dos

resultados definiu-se uma área de medida comum de 625 μm^2 para todas as imagens, sempre com seu centro no ponto de maior intensidade de fluorescência presente na imagem.

2.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância duas vias (ANOVA two-ways). Este teste examina a influência de duas variáveis independentes categóricas diferentes (tratamentos e estruturas) em função de uma variável dependente contínua (intensidade de fluorescência, medida em CV). Esta análise estatística indica se houve diferença significativa da intensidade de fluorescência. Quando houve diferença, foi aplicado o teste “a posteriori” de Tukey, com confronto das médias, visando detectar as diferenças registradas de intensidade de fluorescência dentro das variáveis categóricas (ZAR, 1999).

Todas as análises foram estabelecidas a 5% de significância estatística e efetuadas em ambiente R 3.5.1 (IHAKA & GENTLEMAN, 1996). Gráficos de caixa (boxplot: medianas, quartis e amplitude de variação) foram confeccionados para expressar os resultados sobre a intensidade de fluorescência em função dos tratamentos e estruturas corpóreas dos peixes (raios das nadadeiras anais, caudais, peitorais e escamas).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução osmótica induziu a autofluorescência e não aumentou a intensidade da marcação química na Piracanjuba. Na ausência de indução osmótica prévia, foi encontrada a concentração efetiva para a marcação química de juvenis de Piracanjuba em banhos de curta, média e longa duração. Dentre as estruturas analisadas para comprovar a marcação química, os raios de nadadeiras se mostraram melhores indicadores da marcação do que as escamas.

Os juvenis de Piracanjuba toleraram bem aos tratamentos a que foram submetidos – doses elevadas de alizarina vermelha, longos períodos de exposição e ao choque osmótico – sem apresentar mortalidade ou manifestação de estresse agudo. Essa é uma espécie que apresenta comportamento agonístico em condição de estresse, condição que frequentemente causa mortalidade (Beux et al., 2012). Nesse trabalho, além da sobrevivência da totalidade dos peixes tratados, os mesmos retornaram ao consumo normal de alimento apenas três dias após o manejo. Essa característica da espécie associada à efetividade da marcação química em diversos protocolos testados neste trabalho, torna a espécie indicada para a utilização dessa

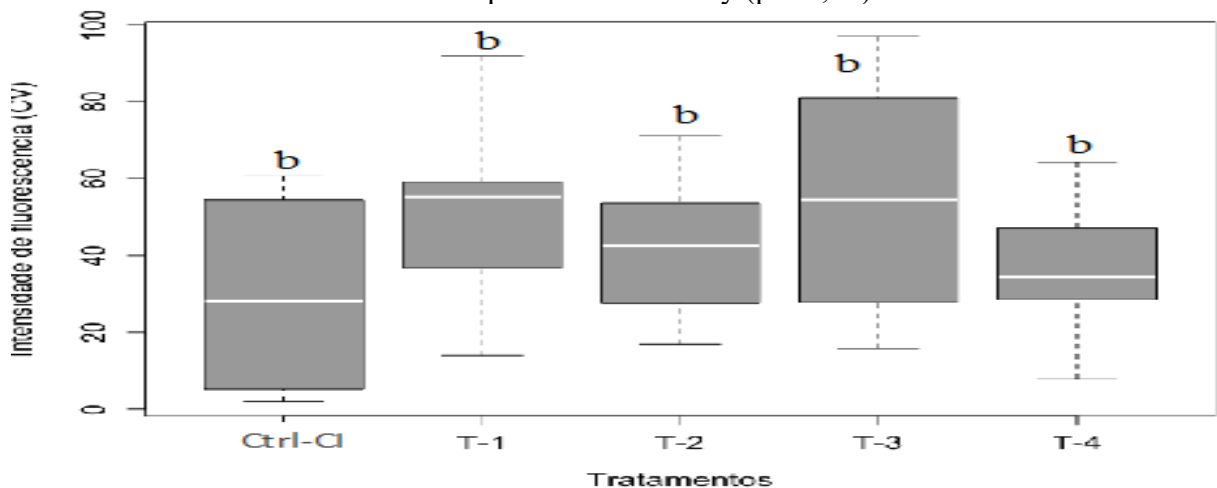
técnica não letal de marcação e de verificação da marca, corroborando resultados obtidos por BASHEY et al. (2014).

A inclusão do choque osmótico na marcação química de peixes tem sido recomendada por facilitar a deposição do corante no tecido ósseo, diminuindo assim o tempo necessário de exposição ao corante (TSUKAMOTO 1985; BECKMAN and SCHULTZ 1996; VAN DER WALT and FARAGHER 2003). Apesar disso, alguns autores têm registrado que o choque osmótico pode induzir a autofluorescência dos tecidos BASHEY (2004) e CROOK et al. (2009). A fluorescência natural dos tecidos é devida a presença de substâncias como flavinas, porfirinas e lipofuscina. Algumas dessas substâncias são encontradas em tecidos como a elastina e colágeno, enquanto que outras são resultado da degradação do tecido sanguíneo (IBÁÑES et al 2012). De acordo com NEUMANN and DETLEF (2002), a elastina produz autofluorescência de cor verde, porém, após o contato com solução salina, passa a emitir fluorescência vermelha.

Em alguns casos, a autofluorescência natural ou induzida pelo choque osmótico apresenta baixa intensidade e é possível diferenciá-la daquela provocada pelo marcador químico utilizado. Essa condição permite que seja construída uma escala categórica de intensidade de fluorescência e assim validar o uso da técnica de marcação química. Essa foi a condição encontrada por ABREU et al. (2014) ao utilizar a oxitetraciclina para a marcação química das escamas de Piavas *Leporinus obtusidens*.

Neste trabalho, a autofluorescência induzida pela indução osmótica apresentou intensidade de fluorescência semelhante ($p > 0,05$) àquela observada pelos peixes submetidos ao marcador químico, independente da concentração e do tempo de exposição (Figura 2).

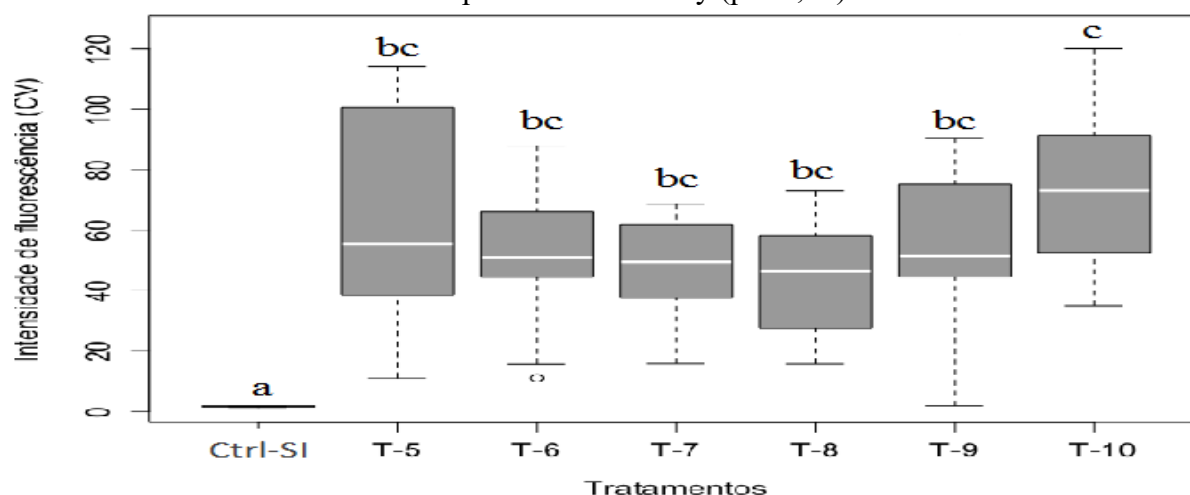
Figura 2 - Intensidade de fluorescência medida em valores de cinza (CV) (medianas, quartis e amplitude de variação) obtidas para os grupos controle e tratamentos precedidos pela indução osmótica. Tratamentos acompanhados de uma mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Legenda:	
Ctrl-CI	Grupo controle com indução osmótica
T-1	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 500mg/L (ARS)
T-2	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 150 mg/L (ARS)
T-3	Banho Médio de 4 horas (BM) – 150 mg/L (ARS)
T-4	Banho Médio de 4 horas (BM) – 50 mg/L (ARS)

Quando avaliados apenas os tratamentos que não receberam a indução osmótica prévia, foi possível observar diferença estatística entre o grupo controle e tratamentos. Foram obtidas concentrações efetivas para a marcação química da Piracanjuba em banhos de curta, média e longa duração ($p < 0,05$) (Figura 3). Todos os tratamentos foram efetivos para a produção de marcas químicas em juvenis de Piracanjuba.

Figura 3 - Intensidade de fluorescência medida em valores de cinza (CV) (medianas, quartis e amplitude de variação) obtidas para os grupos controle e tratamentos não precedidos pela indução osmótica. Tratamentos acompanhados de uma mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



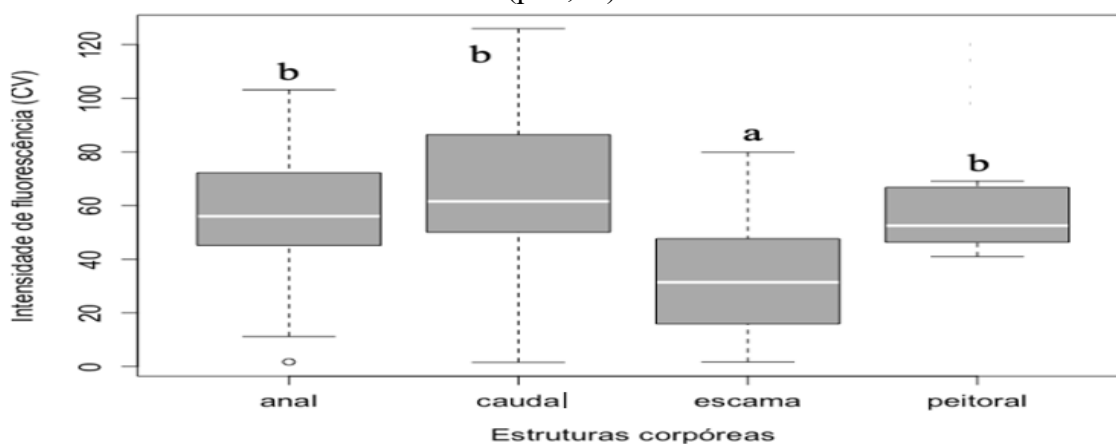
Legenda:	
Ctrl-SI	Grupo controle sem indução osmótica
T-5	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 500 mg/L (ARS)
T-6	Banho Curto de 5 minutos (BC) – 150 mg/L (ARS)
T-7	Banho Médio de 4 horas (BM) – 150 mg/L (ARS)
T-8	Banho Médio de 4 horas (BM) – 50 mg/L (ARS)
T-9	Banho Longo de 18 horas (BL) – 50 mg/L (ARS)
T-10	Banho Longo de 18 horas (BL) – 15 mg/L (ARS)

Considerando que a espécie tolerou bem o manejo adotado, independentemente da concentração de alizarina utilizada ou do tempo de exposição ao produto, está definido um protocolo eficiente de marcação química que pode ser feito em apenas 5 minutos de exposição da Piracanjuba ao produto (150mg/L), ou ainda, utilizando apenas 10% dessa quantidade

quando a exposição é prolongada por 18 horas. Nesses dois protocolos são produzidas marcas com semelhante intensidade de fluorescência ($p > 0,05$).

A eficiência da marcação com alizarina vermelha para juvenis de Piracanjuba foi observada tanto nas escamas quanto nos raios das nadadeiras, porém, com maior intensidade de fluorescência nos raios de nadadeiras ($p < 0,05$), independentemente se originários da nadadeira anal, caudal ou peitoral (Figura 4).

Figura 4 - Intensidade de fluorescência medida em valores de cinza (CV) (medianas, quartis e amplitude de variação) obtidas nas estruturas corpóreas (raios de nadadeiras ou escama) dos exemplares de Piracanjuba (raios das nadadeiras anal, caudal, peitoral e escama) dos tratamentos que não foram submetidos a indução osmótica prévia. Tratamentos acompanhadas de uma mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



2.4 CONCLUSÃO

A Alizarina Vermelha se mostrou eficiente na marcação química de juvenis de *Brycon orbignyanus*. Considerando que a espécie tolerou bem o manejo adotado, independente da concentração de alizarina utilizada ou do tempo de exposição ao produto, são recomendados tanto tratamentos de curta duração, com apenas 5 minutos de exposição a 150mg ARS/L, ou de longa duração, quando os peixes ficam expostos por 18 horas a uma solução contendo apenas 15 mg ARS/L.

A indução osmótica prévia ao tratamento induziu a autofluorescência e impediu a visualização da fluorescência promovida pela alizarina vermelha, não sendo recomendada para a espécie.

Tanto as escamas quanto os raios de nadadeiras podem ser utilizados para comprovação da marcação química com alizarina vermelha na Piracanjuba, porém, os raios das nadadeiras são as estruturas que apresentam a maior intensidade de fluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. R.; ARANTES, T. B.; HERMES-SILVA, S.; ZANIBONI-FILHO, E. (2014). **Oxitetraciclina para marcação química de juvenis de piava *Leporinus obtusidens*: Determinação de doses e duração do tratamento.** Boletim do Instituto de Pesca, 40, 451–457.
- AGOSTINHO, A. A., F. M. PELICICE, L. C. Gomes and H. F. JÚLIO Jr. 2010. **Reservoir fish stocking: when one plus one may be less than two.** *Natureza & Conservação*, 8: 103-111. 2010.
- AGOSTINHO, Angelo Antonio. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil.** Maringá: Eduem, 2007.
- AGOSTINHO, Angelo Antonio. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** 1 E.D. Brasília,DF. MMA. Belo Horizonte, MG. Fundação Biodiversitas. 2v. (1420 p.). I.L. Biodiversidade 19. 2008.
- ARAKI H, SCHMID C; **Is hatchery stocking a help or harm? evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys.** *Aquaculture* 308:S2–S11.2010.
- BARROCA, Tatiana M; GUTIERREZ-ESPINOSA, Alejandro G; BEDORE, Alessandra G. and GOLDINO, Alexandre L. **Coded wire tagging of juvenile curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes): mortality, tag retention, and growth.** *Neotropical Ichthyology*, 13(2): 383-388. DOI: 10.1590/1982-0224-20140074. 2015.
- BASHEY, F. **A comparison of the suitability of alizarin red S and calcein for inducing a nonlethally detectable mark in juvenile guppies.** *Trans Am Fish Soc* 133:1516–1523. 2004
- BAUMGARTNER, Lee. **Adaptive management in action: using chemical marking to advance fish recovery programs in the Murray–Darling Basin.** *Marine and Freshwater Research*, 2016.
- BECKMAN DW and SCHULTZ. **A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds.** *Trans Am Fish Soc* 125:146–149. 1996.
- CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; CANTELMO, O. A.; REGO, R. F. Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. de C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Ed. UFSM. p. 121-145, 2005.
- CROOK DA, O'MAHONY DJ; SANGER AC; MUNRO AR; GILLANDERS BM; THURSTAN S. **Development and evaluation of methods for osmotic induction marking of golden perch *Macquaria ambigua* with calcein and alizarin red.** *S. N Am J Fish Manag* 29:279–287. 2009.
- CROOK, D. A.; MAHONY, D.; GILLANDERS, B. M.; MUNRO, A. R.; SANGER, A. C. **Production of external fluorescent marks on golden perch fingerlings through osmotic induction marking with Alizarin Red S.** *North American Journal of Fisheries Management*, 27, 670–675. 2007.

ECKMANN, R.; CZERKIES, P.; HELMS, C.; KLEIBST K. **Evaluating the effectiveness of stocking vendace (*Coregonus albula* (L.)) eleutheroembryos by alizarin marking of otoliths.** *Advances in Limnology*, 50, 457–463. 1998.

FIELDER, D.G. **Methodology for immersion marking walleye fry and fingerlings in oxytetracycline hydrochloride and its detection with fluorescence microscopy.** Michigan Department of Natural Resources/Fisheries Technical Report. 23p. 2002.

FLETCHER Warren-Myers. **Otolith mass marking techniques for aquaculture and restocking: benefits and limitations.** *Rev Fish Biol Fisheries*. 22 May 2017 / Accepted: 5 March 2018.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: Subordens Characoidei, Bacia do Rio Mogi Guassu.** Piracicaba: Franciscana. v. 2, p. 288-290, 1975.

HERMES-SILVA. **Two chemical marking procedures with Alizarin Red for piava *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837) juveniles.** *Journal of Applied Ichthyology*. Received: 3 November 2015. Accepted: 18 July 2016

IBÁÑEZ, Ana L.; RODRIGUES-CANTO, Antonio; CORTÉS-MARTINÉZ, Jasmín; GARCIA-CALDERÓN, José L. **Evaluation of marking efficiency of different alizarin red concentrations on body fish structures in *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) juveniles.** Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina. México, D.F. 09340. 2012.

IHAKA, R. & GENTLEMAN, R. **A language for data analysis and graphics.** *Journal of Computational and Graphical Statistics*. 5(3):299-314.1996.

LAGARDERE F, THIBAudeau K, BE'GOUT ANRAS ML. **Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red S solutions.** *ICES J Mar Sci* 57:1175–1181. 2000.

LEAL, M.E.; BARBOSA, A.S.; SCHULZ, U.H. **Uso de Implante Visual Fluorescente de Elastômero (VIFE) na marcação de pequenos peixes de água doce.** *Biotemas*, 25(3): 311-315. 2012.

MACHADO, Gláucia Moreira Drumond; PAGLIA, Adriano Pereira. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** 1 E.D. Brasília,DF. MMA. Belo Horizonte, MG. Fundação Biodiversitas. 2v. (1420 p.). I.L. Biodiversidade 19. 2008.

MOHLER JW. **Immersion of larval Atlantic salmon in calcein solutions to induce a non-lethally detectable mark.** *N Am J Fish* 17:751–756. 1997.

MOHLER JW. **Producing fluorescent marks on Atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction.** *N Am J Fish Manag* 23:1108–1113. 2003.

MOUCHREK FILHO, V.E. **Estudo voltamétrico do complexo de cobre(II) com o ligante Vermelho de Alizarina S adsorvido na superfície do eletrodo de grafite pirolítico.** *Quimica nova* 22(3) 312-315. 1999.

- NAGIEĆ, M., CZERKIES, P., GORYCZKO, K., WITKOWSKI, A., & MURAWSKA E. (1995). **Mass-marking of grayling, *Thymallus thymallus* (L.), larvae by fluorochrome tagging of otoliths.** *Fisheries Management and Ecology*, 2(3), 185–195. doi: 10.1111/j.1365-2400.1995.
- NANDOR, G. F., J. R. LONGWILL & D. L. WEBB. **Overview of the coded wire tag program in the greater Pacific Region of North America.** Pp. 5-20. In: Wolf, K. & J. O'Neal (Eds.). **Tagging, telemetry, and marking measures for monitoring fish populations. A compendium of new and recent Science for use in informing technique and decision modalities.** (Pacific Northwest Aquatic Monitoring Partnership (PNAMP) Special Publication series, 2010-002).
- NEUMANN, M.; G. Detlef. **Método Simples para Redução da Autofluorescência em Microscopia de Fluorescência.** *J. Histochem. Cytochem.* 50: 437-439. 2002.
- NIELSEN, L. A. **Methods of marking fish and shellfish.** Bethesda, MD, American Fisheries Society, 208p. 1992. Pls. 1-16
- TSUKAMOTO, K. **Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline tagging of otoliths.** *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51:903–911. 1985.
- VAN DER WALT B; FARAGHER RA. **Otolith marking of rainbow trout fry by immersion in low concentrations of alizarin complexone.** *N Am J Fish Manag* 23:141–148. 2003.
- VIEIRA, F. and P. S. POMPEU. **Peixamentos: uma alternativa eficiente?** *Ciência Hoje*, 30: 28-33. 2001.
- ZANIBONI-FILHO, E. **Projeto de extensão: programa de monitoramento e manejo da ictiofauna do Alto Rio Uruguai. 2 – desvio do rio e enchimento.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; Departamento de Aquicultura. 1999.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis.** 4th Ed. Prentice Hall. 663p. 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

- ABREU, M. R.; ARANTES, T. B.; HERMES-SILVA, S.; ZANIBONI-FILHO, E. (2014). **Oxitetraciclina para marcação química de juvenis de piava *Leporinus obtusidens*: Determinação de doses e duração do tratamento.** Boletim do Instituto de Pesca, 40, 451–457.
- AGOSTINHO, Angelo Antonio. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil.** Maringá: Eduem, 2007.
- ARAKI H, SCHMID C; **Is hatchery stocking a help or harm? evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys.** Aquaculture 308:S2–S11.2010.
- BARROCA, Tatiana M; GUTIERREZ-ESPINOSA, Alejandro G; BEDORE, Alessandra G. and GOLDINO, Alexandre L. **Coded wire tagging of juvenile curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes): mortality, tag retention, and growth.** Neotropical Ichthyology, 13(2): 383-388. DOI: 10.1590/1982-0224-20140074. 2015.
- BASHEY, F. **A comparison of the suitability of alizarin red S and calcein for inducing a nonlethally detectable mark in juvenile guppies.** Trans Am Fish Soc 133:1516–1523. 2004
- BAUMGARTNER, Lee. **Adaptive management in action: using chemical marking to advance fish recovery programs in the Murray–Darling Basin.** Marine and Freshwater Research, 2016.
- BECKMAN DW and SCHULTZ. **A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds.** Trans Am Fish Soc 125:146–149. 1996.
- CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; CANTELMO, O. A.; REGO, R. F. Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. de C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Ed. UFSM. p. 121-145, 2005.
- CROOK, D. A.; MAHONY, D.; GILLANDERS, B. M.; MUNRO, A. R.; SANGER, A. C. Production of external fluorescent marks on golden perch fingerlings through osmotic induction marking with Alizarin Red S. North American Journal of Fisheries Management, 27, 670–675. 2007.
- ECKMANN, R.; CZERKIES, P.; HELMS, C.; KLEIBST K. **Evaluating the effectiveness of stocking vendace (*Coregonus albula* (L.)) eleutheroembryos by alizarin marking of otoliths.** Advances in Limnology, 50, 457–463. 1998.
- FIELDER, D.G. **Methodology for immersion marking walleye fry and fingerlings in oxytetracycline hydrochloride and its detection with fluorescence microscopy.** Michigan Department of Natural Resources/Fisheries Technical Report. 23p. 2002.
- GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: Subordens Characoidei, Bacia do Rio Mogi Guassu.** Piracicaba: Franciscana. v. 2, p. 288-290, 1975.

- LAGARDERE F, THIBAUDEAU K, BE'GOUT ANRAS ML. **Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red S solutions.** ICES J Mar Sci 57:1175–1181. 2000.
- LEAL, M.E.; BARBOSA, A.S.; SCHULZ, U.H. **Uso de Implante Visual Fluorescente de Elastômero (VIFE) na marcação de pequenos peixes de água doce.** Biotemas, 25(3): 311-315. 2012.
- MOHLER JW. **Immersion of larval Atlantic salmon in calcein solutions to induce a non-lethally detectable mark.** N Am J Fish 17:751–756. 1997.
- MOHLER JW. **Producing fluorescent marks on Atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction.** N Am J Fish Manag 23:1108–1113. 2003.
- MOUCHREK FILHO, V.E. **Estudo voltamétrico do complexo de cobre(II) com o ligante Vermelho de Alizarina S adsorvido na superfície do eletrodo de grafite pirolítico.** Química nova 22(3) 312-315. 1999.
- NAGIEĆ, M., CZERKIES, P., GORYCZKO, K., WITKOWSKI, A., & MURAWSKA E. (1995). **Mass-marking of grayling, *Thymallus thymallus* (L.), larvae by fluorochrome tagging of otoliths.** Fisheries Management and Ecology, 2(3), 185–195. doi: 10.1111/j.1365-2400.1995.
- NANDOR, G. F., J. R. LONGWILL & D. L. WEBB. **Overview of the coded wire tag program in the greater Pacific Region of North America.** Pp. 5-20. In: Wolf, K. & J.
- NIELSEN, L. A. **Methods of marking fish and shellfish.** Bethesda, MD, American Fisheries Society, 208p. 1992.
Pls. 1-16
- TSUKAMOTO, K. **Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline tagging of otoliths.** Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 51:903–911. 1985.
- VAN DER WALT B; FARAGHER RA. **Otolith marking of rainbow trout fry by immersion in low concentrations of alizarin complexone.** N Am J Fish Manag 23:141–148. 2003.
- VIEIRA, F. and P. S. POMPEU. **Peixamentos: uma alternativa eficiente?** Ciência Hoje, 30: 28-33. 2001.