



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

CRESCIMENTO E RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DO  
DOURADO (*Salminus brasiliensis*) EM DIFERENTES  
DENSIDADES DE ESTOCAGEM E MANUSEIOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Aqüicultura.

Orientador: Alex Pires de Oliveira Nuñez  
Co-orientador: Alcir Luiz Dafré

Neiva Braun

Florianópolis - SC  
2010

Braun, Neiva

Crescimento e respostas bioquímicas do dourado (*Salminus brasiliensis*) em diferentes densidades de estocagem e manuseios / Neiva Braun - 2010.

105 f.: 8 fig., 9 tabs.

Orientador: Alex Pires de Oliveira Nuñez.

Co-orientador: Alcir Luiz Dafré

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1. Crescimento 2. Densidade 3. Manuseio 4. Tanques-rede 5. Estresse 6. *Salminus brasiliensis*.

**Crescimento e respostas bioquímicas do dourado (*Salminus brasiliensis*) em diferentes densidades de estocagem e manuseios.**

Por

NEIVA BRAUN

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

**DOUTORA EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

---

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Orientador*

---

Dr. Aldi Feiden

---

Dr. David Augusto Reynalte Tataje

---

Dr. Evoy Zaniboni Filho

---

Dra. Mônica Yumi Tsuzuki



## DEDICATÓRIA

A todos que acreditaram neste trabalho...

"De tanto ver triunfar as nulidades,  
de tanto ver prosperar a desonra,  
de tanto ver crescer a injustiça,  
de tanto ver agigantarem-se os poderes nas mãos dos maus,  
o homem chega a desanimar da virtude,  
a rir-se da honra,  
a ter vergonha de ser honesto."

Rui Barbosa

(Senado Federal, RJ, Obras Completas,  
Rui Barbosa. v. 41, t. 3, 1914, p. 86)



## AGRADECIMENTO

Ao meu orientador prof. Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez pela oportunidade de participar do grupo LAPAD, pelas valiosas contribuições nas análises estatísticas e discussões no processo de redação desta tese e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao meu co-orientador Dr. Alcir Luiz Dafré, pelo empréstimo do laboratório e ensinamentos.

Ao Dr. Bernardo Baldisserotto, pelo empréstimo do laboratório e amizade.

Ao professor Evoy Zaniboni-Filho pelo apoio concedido.

A todos os professores integrantes do Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura que contribuíram para o aprimoramento deste estudo.

Ao Secretário do Departamento de Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, Carlito Klunk, pelo auxílio nos trâmites burocráticos e ajuda.

Aos funcionários do LAPAD que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo, especialmente a Claudia Machado, pela amizade e ajuda para viabilizar o desenvolvimento bioquímico da tese.

Ao doutorando Ronaldo Lima de Lima, pela presença e ajuda constante, desde a redação do projeto, larvicultura, preparação dos viveiros de terra, transporte dos alevinos, despesca, organização das unidades experimentais, biometrias, coleta de material biológico e análises bioquímicas.

Aos colegas, que pela presença, apoio e amizade foram fundamentais para o êxito deste estudo, especialmente:

Renato E. Kitagima e Leandro F. Lemos pela ajuda na larvicultura e despesca nos viveiros de terra;

Fanny A. Yasumaru, Josiane Ribolli, Michele C. Nunes e Marta Braun, pela ajuda na biometria e na coleta do material biológico;

Alexssandro Becker, do Laboratório de Fisiologia de Peixes, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde da UFSM/RS, pela colaboração nas análises iônicas;

Rafael Trevisan, do Laboratório de Defesa Celular, do Departamento de Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências Biológicas da UFSC/SC, por ensinar as técnicas de análises enzimáticas;

Lucas M. da Cunha e Tié Ferreira pela análise da qualidade de água;

Luis F. Beux e Fernanda F. Brol, da Aquática Consultoria e Assessoria, pela ajuda na instalação do experimento dos tanques-rede;

Talita M. de Souza, Nasare Bona, Rafael Alves, Mauricio Lehmann e Cintia Kaefer pelas acaloradas discussões bioquímica;

Ana Paula, Rodrigo e Patrícia, Maria do Carmo, Jhon, Fernando, Vitor, Nélia, Giovanni, Aparício, Hirla, Daniela, Danielle, Ricardo, Jackson e Francieli, Márcia Nascimento, Roberta, Karine, Marina, Daniel, Gledson, Bethowen, Renata, Samira, Marcos, Maurício, Ronaldo da Silva, Pedrão, Luciano, Everton, Flávia, Maude, Dariane, David, Samara, Fabrício, Rachel, Kenzo, Maria Eugenia, Márcia Vanacor pelas conversas descontraídas e momentos agradáveis.

As demais pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

Nos sistemas intensivos de cultivo de peixes é comum a presença dos agentes estressores que interferem no metabolismo e no crescimento. Considerando isso, foi estudado o efeito dos agentes estressores densidade de estocagem e manuseio sobre o crescimento e sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas de alevinos de *Salminus brasiliensis*, assim como as respostas dessa espécie ao estresse. Parte do estudo foi conduzido em laboratório, avaliando as densidades de 30, 150 e 300 peixes  $m^{-3}$ , com presença e ausência de manuseio por 80 dias, e a outra parte foi conduzida em tanques-rede, no reservatório de Itá, avaliando as densidades de 15 e 30 peixes  $m^{-3}$ , com manuseio por 40 dias. As variáveis analisadas foram: comprimento padrão e peso total, hematócrito (Ht) no sangue e hemoglobina ([Hb]), glicose e lactato, atividade das enzimas hepáticas antioxidantes glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, catalase e as concentrações de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  e  $Ca^{2+}$  no plasma e nas brânquias. Os resultados indicaram que os alevinos de *S. brasiliensis* apresentaram melhor crescimento na ausência do manuseio e na densidade de 30 peixes  $m^{-3}$ . A atividade das enzimas antioxidantes foi dependente do manuseio e do tempo, condição que não foi observada para a [Hb], para o Ht, para o lactato e para os íons  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  no plasma. As variações da concentração de glicose e do Ht nos peixes com manuseio sugerem a ocorrência de estresse agudo, assim como as da glicose e do lactato na ausência do manuseio.

## ABSTRACT

In intensive fish culture the presence of stress factors are commonque interferem no metabolismo e crescimento. Considering this, we studied the effect stress factors stocking density and handling on the growth and on the physiological and biochemical responses of *Salminus brasiliensis* fingerlings, as well as its responses to stress. Part of the study was conducted in the laboratory, evaluating densities 30, 150 and 300 fish m<sup>-3</sup>, with and without handling for 80 days, and the other part was conducted in cages, in the reservoir of Itá Hydroelectric Power Plant, evaluating the densities 15 and 30 fish m<sup>-3</sup> with handling for 40 days. The measured variables were: standard length and total weight, hematocrit (Ht) and blood hemoglobin ([Hb]), glucose and lactate, the activity of antioxidant enzymes glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, catalase and the concentrations of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in plasma and in the gills. The results indicated that juveniles of *S. brasiliensis* presented better growth in the absence of handling and at density of 30 fish m<sup>-3</sup>. The activity of antioxidant enzymes was dependent on the handling and time, a condition that was not observed for [Hb], Ht, lactate and for ions Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in plasma. Changes in glucose concentration and hematocrit in handled fish suggest that acute stress was present, as well as glucose and lactate changes in the absence of handling.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Desempenho de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades de estocagem na presença (círculo fechado) e ausência (círculo aberto) de manuseio aos 80 dias. (A) peso, (B) comprimento padrão, (C) consumo alimentar diário aparente, (D) biomassa e (E) conversão alimentar aparente. Peso e o comprimento padrão inicial dos peixes cultivados na presença (+) ou ausência do manuseio (□). As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam significados diferentes ( $P < 0,05$ ) entre o coeficiente de regressão para peixes manuseados (círculo fechado) ou não manuseados (círculo aberto)..... 38
- Figura 2. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades de estocagem nos tratamentos com presença de manuseio aos 20, 40, 60 e 80 dias. Atividade da (A) glutathiona redutase (GR), (B) da glutathiona-S-transferase (GST), (C) glutathiona peroxidase (GPx), (D) concentração da glicose plasmática, (E) hemoglobina, (F) hematócrito, (G) lactato plasmático e (H) atividade da catalase. Densidade de estocagem: 30 (×), 150 (◊) e 300 m<sup>-3</sup>. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média..... 39
- Figura 3. Concentrações de íons nas brânquias de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades na presença de manuseio. Concentrações de íons nas brânquias: (A) Na<sup>+</sup>, (B) Cl<sup>-</sup>, (E) K<sup>+</sup>, (F) Ca<sup>2+</sup>. Concentrações de íons na água: (C) Na<sup>+</sup>, (D) Cl<sup>-</sup>, (G) K<sup>+</sup>, (H) Ca<sup>2+</sup>. Densidade de estocagem: 30 (×), 150 (◊) e 300 (◈) m<sup>-3</sup>. As linhas acima dos símbolos representam o desvio da média..... 40
- Figura 4. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades de estocagem nos tratamentos com manuseio aos 80 dias. Atividade da (A) glutathiona redutase (GR), (B) glutathiona-S-transferase (GST), (C) glutathiona peroxidase (GPx), (D) concentração da glicose plasmática, (E) hemoglobina, (F) atividade da catalase, (G) concentração Na<sup>+</sup> branquial e

(H) Cl<sup>-</sup> branquial. Letras iguais indicam significados similares ( $P < 0,05$ ) entre os coeficientes de regressão de peixes cultivados na presença (círculo fechado) e ausência (círculo aberto) de manuseio. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média..... 41

Figura 5. (A) hematócrito e (B) concentração da glicose plasmática entre os intervalos de coleta 0 – 10 min, 11 – 20 min e 21 – 30 min em *Salminus brasiliensis* com manuseio. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os intervalos de amostragem nos dias 40, 60 e 80. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média..... 59

Figura 6. Concentração da (A) glicose plasmática e (B) lactato plasmático entre os intervalos de coleta 0 – 10 min, 11 – 20 min e 21 – 30 min em *Salminus brasiliensis* sem manuseio aos 80 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os intervalos de amostragem. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média..... 59

Figura 7. Concentrações da (A) glicose, (B) lactato plasmático, (C) hemoglobina e (D) hematócrito de juvenis de *Salminus brasiliensis* criados em tanques-rede no reservatório da UHE Itá nas densidades de 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup>, por 40 dias. Letras minúsculas diferentes representam a diferença (teste t;  $P < 0,05$ ) entre as densidades em um mesmo dia. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença (teste t;  $P < 0,05$ ) de uma mesma densidade de estocagem em dias diferentes. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média..... 74

Figura 8. (A) Alevino de *Salminus brasiliensis*; (B) coleta de sangue com seringa heparinizada; (C) unidades experimentais de cultivo em laboratório e (D) tanques redes no reservatório de Itá ..... 105

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Hematócrito (Ht), hemoglobina ([Hb]) e íons teciduais de *Salminus brasiliensis* e da água de cultivo. Os valores foram calculados para todo o período de estudo (20, 40, 60 e 80 dias). A composição iônica da água de cultivo foi avaliada ao final do experimento (80 dias). Os dados são apresentados com as médias  $\pm$  desvio padrão, n = número de amostras, M = peixes manuseados, SM = peixes sem manuseio..... 42
- Tabela 2. Parâmetros sanguíneos, plasmáticos e brânquias de *Salminus brasiliensis* que apresentam diferenças significativas (\*) ou não significativas (ns) entre as densidades de 30, 150 e 300 peixes m<sup>-3</sup>, em diferentes dias de amostragem, utilizando o teste de Tukey ou de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ). SM = sem manuseio. na = não analisado. Dados de glicose no dia 20 e dos íons Cl<sup>-</sup> e Na<sup>+</sup> no dia 60 não foram analisados devido a problemas técnicos..... 57
- Tabela 3. Peso, comprimento padrão, biomassa total, conversão alimentar aparente, consumo alimentar diário aparente (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis de *Salminus brasiliensis* criados em tanques-rede nas densidades de 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup> por 40 dias. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre as densidades de estocagem. n = número de peixes amostrados..... 70
- Tabela 4. Ração oferecida, sobra e consumo de ração (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis *Salminus brasiliensis* cultivados em tanques-rede nas densidades de 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup> por 40 dias..... 71
- Tabela 5. Respostas de estresse agudo da glicose, do lactato, da hemoglobina e do hematócrito de *Salminus brasiliensis* aos 20 e 40 dias, criados em tanques-rede no reservatório da UHE Itá nas densidades de 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup>, através da análise dos parâmetros em intervalos de amostragem de 0-10, 11-20 e 21-30 min. Os parâmetros onde a densidade não exerceu influencia foram distribuídos independentemente da densidade de estocagem a qual pertenciam. Os parâmetros influenciados pela densidade

foram distribuídos nas densidades as quais pertenciam.....	76
Tabela 6. Número de alevinos de <i>Salminus brasiliensis</i> e volume de água utilizado nos experimentos com presente/ausência de manuseio em laboratório.....	101
Tabela 7. Cálculos para determinação das concentrações de glicose, lactato, hemoglobina [Hb] e do hematócrito (Ht).....	102
Tabela 8. Cálculos para determinação dos valores dos íons através das equações obtidas da curva padrão.....	103
Tabela 9. Cálculos para determinação da atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx), da glutathione transferase (GST), da glutathione reduzida (GR) e da catalase (CAT)...	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrofina

Ca<sup>2+</sup>: cátion cálcio

CAT: catalase

CDNB: substrato clorodinitrobenzeno

Cl<sup>-</sup>: ânion cloro

Cl<sub>50</sub>: concentração letal - 96 horas

CO<sub>3</sub><sup>-</sup>: ânion carbonato

ERMO: espécies reativas do metabolismo do oxigênio

GPx: glutaciona peroxidase

GR: glutaciona redutase

GSH: glutaciona reduzida

GST: glutaciona S-transferase

H<sup>+</sup>: cátion hidrogênio

[Hb]: concentração de hemoglobina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HO<sub>2</sub><sup>-</sup>: hidroperoxila

HOCl: ácido hipocloroso

Hsp: proteínas de choque térmico

Ht: hematócrito

K<sup>+</sup>: cátion potássio

Na<sup>+</sup>: cátion sódio

NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida

NH<sub>3</sub>: amônia não ionizada

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: cátion amônio

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxigênio singlet

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido

OD: oxigênio dissolvido

OH<sup>-</sup>: radical hidroxila

ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito

RNS: espécie reativa de nitrogênio

RO<sup>-</sup>: radical alcoxila

RO<sub>2</sub><sup>-</sup>: radical peroxila

ROS: espécies reativas de oxigênio

## SUMÁRIO

Introdução.....	17
Capítulo I.....	31
Crescimento e respostas bioquímicas e fisiológicas de <i>Salminus brasiliensis</i> em diferentes densidades de estocagem e manuseio.....	31
Capítulo II.....	53
Respostas de estresse agudo na criação de alevinos de <i>Salminus brasiliensis</i> .....	53
Capítulo III.....	67
Crescimento e resposta de estresse de dourados criados em tanques-rede.....	67
Conclusões gerais.....	81
Referências bibliográficas da introdução.....	82
Anexos.....	99
I. Reação de Fenton e de Haber-Weiss.....	99
II. Alguns procedimentos adotados na produção de alevinos de <i>Salminus brasiliensis</i> .....	100
III. Número de alevinos de <i>Salminus brasiliensis</i> e volume de água utilizado nos experimentos com presente/ausência de manuseio em laboratório .....	101
IV. Cálculos para determinação das concentrações de glicose, lactato, hemoglobina [Hb] e do hematócrito (Ht).....	102
V. Cálculos para determinação dos valores dos íons através das equações obtidas da curva padrão.....	103
VI. Cálculos para determinação da atividade enzimática da glutatona peroxidase (GPx), da glutatona transferase (GST), da glutatona reduzida (GR) e da catalase (CAT)....	104
VII. Alevino de <i>Salminus brasiliensis</i> (A), coleta de sangue com seringa heparinizada (B), unidades experimentais de cultivo em laboratório (C) e tanques redes no reservatório de Itá (D).....	105



## INTRODUÇÃO

Existe uma tendência mundial de se criar peixes em sistemas intensivos de cultivo, com controle sobre a seleção dos animais, sobre o manejo alimentar e sobre a vigilância sanitária.

No entanto, os custos operacionais iniciais destes sistemas são elevados e as altas taxas de sobrevivência e de crescimento são fundamentais para compensar os elevados custos de produção (Wedemeyer, 1996; Lima et al., 2006). O aumento da densidade de estocagem contribui para o aumento da produtividade (Papoutsoglou et al., 1998; Sado et al., 2006), e portanto, é importante na amortização desses custos. Porém, as altas densidades de estocagem podem trazer conseqüências indesejáveis, como alterações no metabolismo dos peixes devido ao alto nível de estresse (Mazur e Iwama, 1993; Barcellos et al., 1999) e degradação do meio ambiente pelo acúmulo de resíduos nitrogenados provenientes dos alimentos e da excreção dos peixes (Jobling, 1994; Baldisserotto, 2006). A degradação da qualidade da água contribui para a proliferação e para a transmissão de doenças, provocando surtos epidêmicos que podem ser fatais (Pavanelli et al., 1998; Montero et al., 1999; Ozório et al., 2004).

A definição da densidade de estocagem considerada ótima para uma dada espécie é um dos passos iniciais para o estabelecimento de um sistema de cultivo (Souza Filho, 2000). A densidade de estocagem ideal ou a definição do que seja uma alta ou baixa densidade de estocagem depende do tamanho dos exemplares, do sistema de cultivo utilizado e da espécie cultivada (Piaia e Baldisserotto, 2000; Baldisserotto, 2002).

Na avaliação da densidade de estocagem/crescimento convém analisar o peso individual dos peixes, a produtividade (peixes/área ou volume) e a conversão alimentar, pois a densidade de estocagem que propicia o maior peso individual geralmente não é a mesma em que se consegue a maior produtividade ou a melhor conversão alimentar (Baldisserotto, 2002). Em sistema de cultivo extensivo e intensivo de lagos, a densidade de peixes é expressa como a biomassa de peixes por área de superfícies da lagoa (Conte, 2004) ou peso por unidade de volume de água (Wedemeyer, 1996)

Outros fatores como a quantidade e a qualidade da água, e a qualidade da ração utilizada interferem no desenvolvimento da espécie cultivada.

Por esses motivos vários trabalhos foram desenvolvidos avaliando a densidade para diferentes espécies, sistemas de cultivo e diferentes estágios de desenvolvimento. Os resultados demonstram que

para algumas espécies as densidades testadas não afetaram o crescimento e a sobrevivência dos peixes, como foi registrado para juvenis de *Tinca tinca* nas densidades de 0,18 e 4,0 g L<sup>-1</sup> (Celada et al., 2007) e juvenis de *Arapaima gigas* nas densidades 15, 20 e 25 peixes m<sup>-3</sup> (Cavero et al., 2003). Em outras espécies o aumento da produção foi proporcional ao aumento da densidade, como demonstram estudos com *Rhamdia quelen*, na fase larval nas densidades de 100, 200 e 300 peixes m<sup>-3</sup> (Barcellos et al., 2004) e na fase de alevino nas densidades de 114, 227 e 454 peixes m<sup>-3</sup> (Piaia e Baldisserotto, 2000); em alevinos de *Oreochromis niloticus* nas densidades de 75, 150, 300 e 600 peixes m<sup>-3</sup> (Bozano et al., 1999) e em alevinos de tilápia vermelha tetrahíbrida (linhagem de Israel) nas densidades de 2, 3 e 4 peixes (Silva et al., 2000). As larvas de *Brycon cephalus* cultivadas nas densidades de 30, 60 e 120 larvas m<sup>-2</sup>, também apresentaram maior produtividade nas maiores densidades, mas o aumento da densidade reduziu o crescimento e a homogeneidade (Gomes et al., 1999). O aumento da densidade produziu efeito negativo sobre o cultivo de alevinos *Oncorhynchus clarkii*. Neste estudo foram realizados experimentos distintos, nas densidades 338, 739 e 1634 peixes m<sup>-3</sup> e 768, 1597, 2073 e 2998 peixes m<sup>-3</sup>. As densidades acima de 1600 peixes m<sup>-3</sup> comprometeram a saúde dos peixes (Wagner et al., 1997). Densidade mais baixa também foi indicada para alevinos de *Colossoma macropomum* (Souza et al., 1998), uma vez que o melhor resultados foi obtido com 21 peixes m<sup>-3</sup> entre as densidades 15, 21, 27 e 34 peixes m<sup>-3</sup>. Para os híbridos juvenis de *Lepomis cyanellus* e *L. macrochyrus* cultivados nas densidades de 200 e 800 peixes m<sup>-3</sup> foi observada redução no crescimento nas duas densidades, sendo que estas reduções foram produzidas pela alta atividade e pelo estresse de interação social entre os animais da baixa densidade e pelo reduzido consumo alimentar entre os animais da densidade mais alta (Wang et al., 2000).

A criação de peixes em tanques-rede, principalmente em locais onde não é possível a drenagem para a despesca, é uma alternativa que vem crescendo e apresentando vantagens sobre a pesca extrativista e a piscicultura tradicional do ponto de vista técnico, ecológico, social e econômico (Schmittou, 1993 apud Sampaio e Braga, 2005). Entre as vantagens, destacam-se a redução significativa do manejo, quando comparado com os viveiros de terra tradicionalmente utilizados, a diminuição do espaço físico utilizado no cultivo, o baixo investimento inicial, a utilização de reservatórios para piscicultura e a possibilidade do produtor trabalhar com mais de uma espécie na mesma

Foram desenvolvidos estudos em tanques-rede avaliando diferentes densidades de cultivo na fase de recria em juvenis de *C. macropomum* e *Brycon amazonicus* cultivados nas densidades 200, 300, 400 e 500 peixes m<sup>-3</sup>. A melhor densidade para *C. macropomum* foi de 400 peixes m<sup>-3</sup> e para *Brycon amazonicus* 500 peixes m<sup>-3</sup>. Para alevinos de *Clarias gariepinus* nas densidades de 50, 100, 150 e 200 peixes m<sup>-3</sup> foi registrada redução na taxa de crescimento com o aumento da densidade, mas a estimativa de produção e de despesca aumentou proporcionalmente ao aumento da densidade (Hengsawat et al., 1997). Já para as tilápias-vermelha da Flórida (*O. mossambicus* x *O. urulepis hornorum*) cultivadas nas densidades de 25, 50, 75 e 100 peixes m<sup>-3</sup> e para os alevinos *O. niloticus* nas densidades 150, 200 e 250 peixes m<sup>-3</sup> o aumento da biomassa foi proporcional ao aumento da densidade (Carneiro et al., 1999; Sampaio e Braga, 2005).

Além da densidade de estocagem, os peixes criados em sistemas de cultivo intensivo são expostos a outros agentes estressores rotineiros, como a captura, o manejo, o adensamento, a classificação, o transporte, o tratamento de doenças e a contaminação dos corpos de água por ação antropogênica (Wedemeyer, 1996; Barcellos et al., 1999; Kubílai e Uluköy, 2002; Iwama et al., 2004; Urbinati e Carneiro, 2004). Entre estes fatores estressores a captura, que envolve a perseguição e a exposição dos peixes ao ar, é um dos procedimentos com maior poder estressor na criação de peixes (Kubílai e Uluköy, 2002; Urbinati e Carneiro, 2004; Hoshiba et al., 2006; 2009), devido ao manuseio do animal no ambiente terrestre.

O estresse pode se manifestar de forma aguda ou crônica. O estresse agudo é definido como um estressor intenso de curta duração, enquanto o estressor crônico envolve distúrbios a longo prazo (Ruane, 2002). O manejo, as alterações bruscas de ambiente, as rápidas mudanças de temperatura, o confronto com predadores, o transporte, as redes e o confinamento são alguns dos agentes que produzem estresse agudo (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Kubílai e Uluköy, 2002), que dependendo da frequência de ocorrência pode se tornar crônico. Entre os principais agentes que causam estresse crônico estão às altas densidades de estocagem (superpopulação), a deterioração da qualidade de água, a presença de patógenos ou poluentes (Wendelaar Bonga, 1997, Ruane, 2002).

O estresse é um conjunto de respostas dos organismos diante de estímulos agressivos ou ameaçadores que são controladas pelos sistemas nervoso e hormonal, e que produzem alterações fisiológicas para manter a homeostase corporal (Barton e Iwama, 1991). Estas mudanças

fisiológicas são de natureza adaptativa e normalmente permitem ao peixe recuperar a homeostase, o que aumenta a sua chance de sobrevivência (Wedemeyer, 1996; Iwama et al., 2005). As respostas adaptativas apresentam um limite de tolerância, que depende do tipo e da intensidade do agente estressor, do tempo que o organismo permanece sob o efeito estressante e da espécie de peixe (Moraes e Martins, 2004; Iwama et al., 2005). As situações de estresse severo ou de longo período de duração podem prejudicar a saúde e o bem-estar dos peixes. Nesta situação o peixe pode não conseguir recuperar sua homeostase, o que compromete a sua recuperação e o seu desempenho (Barton e Iwama, 1991; Wedemeyer, 1996; Barton, 2002).

As respostas dos peixes aos agentes estressores envolvem todos os níveis de organização, desde a célula para o organismo individual até a estrutura populacional para o conjunto dos organismos. Estas respostas envolvem mudanças comportamentais e modificações fisiológicas, hormonais e celulares (Iwama et al., 2005).

As respostas a nível celular se caracterizam pela ativação das células da classe de proteínas de choque térmico (Hsp) que protegem o organismo contra choques. Estas proteínas estão relacionadas com o sistema neuroendócrino e também são importantes na manutenção da homeostase (Ackerman et al., 2000).

As mudanças fisiológicas e químicas compensatórias relacionadas às respostas ao estresse são divididas em primária, secundária e terciária.

A resposta primária ao estresse em peixes/vertebrados está relacionada com a hipersecreção de catecolaminas (adrenalina ou noradrenalina ou epinefrina e noroepinefrina) e de corticosteróides (cortisol). Após a percepção do estímulo estressor pelo sistema nervoso central ocorre liberação de corticotrofina para o hipotálamo, que estimula a pituitária a liberar o hormônio adrenocorticotrofina (ACTH). O ACTH circula para o interior do rim cefálico, onde estimula as células interrenais, localizadas na região rim-cefálica ao longo da veia cardinal, e seus ramos para a produção de cortisol e de hormônios corticosteróides (Wedemeyer, 1996; Mommsen et al., 1999). O sistema nervoso simpático estimula o tecido cromafim no rim a produzir hormônios catecolaminas, inclusive a adrenalina. Estes hormônios iniciam mudanças cardiovasculares como o aumento da pressão e do fluxo sanguíneo. Essas e outras mudanças desencadeiam um amplo conjunto de alterações bioquímicas e fisiológicas, que produzem outros tipos de respostas (Jobling, 1994; Wendelaar Bonga, 1997; Wedemeyer, 1996; Iwama et al., 2005).

As respostas secundárias iniciam com a hiperglicemia, produzida pela ação dos hormônios dos estresses (catecolaminas e cortisol) secretados durante a reação de alarme, sendo a fonte energética para ações de luta ou de fuga. O aumento dos níveis de glicose no plasma ocorre pela ativação da glicogenólise/gliconeogênese e pela inibição da glicólise (Hazon e Balment, 1997), sendo que inicialmente é metabolizado o glicogênio do fígado, cuja concentração se reduz. Se a condição estressora persistir, a hiperglicemia é mantida pelo aumento dos níveis de cortisol que conduz à glicólise/gliconeogênese das proteínas e dos lipídios (Vijayan et al., 1991; Wedemeyer, 1996).

Estas respostas têm efeito cascata e incluem, além da hiperglicemia, a depleção da reserva de glicogênio, o catabolismo das proteínas celulares e a alteração sanguínea dos níveis de proteína, de colesterol e de ácidos graxos (Thomas, 1990; Jobling, 1994; Wendelaar Bonga, 1997). Este conjunto de modificações, controladas pelo sistema neuroendócrino, conduz à chamada resposta terciária, caracterizada pela redução do crescimento, pela deteriorização da resistência para doenças infecciosas e pelas mudanças comportamentais, que reduzem o sucesso reprodutivo e a sobrevivência (Wedemeyer, 1996).

O sistema neuroendócrino também apresenta papel fundamental na adaptação osmorregulatória dos peixes. O fluxo de íons nas brânquias, e conseqüentemente o fluxo iônico corporal são rapidamente modificados por alterações da adrenalina/cortisol e pelas condições ambientais (Wedemeyer, 1996; McCormick, 2001; Baldisserotto, 2006). O aumento da circulação das catecolaminas aumenta a permeabilidade das brânquias, que leva à hemodiluição e que reduz o volume do hematócrito (Wang et al., 2004).

Nas brânquias estão localizadas as células de cloreto, que apresentam papel importante na regulação osmótica, pois são responsáveis pelo transporte dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  da água para o sangue (Wedemeyer, 1996; Marshall e Grosell, 2005). Os principais mecanismos de transporte de íons envolvem a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que cria um ambiente favorável à entrada de  $\text{Na}^+$  no organismo através de um cotransportador ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ou  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ ) ou através de um canal de  $\text{Na}^+$ . Estes sistemas de cotransporte permitem que o peixe absorva  $\text{Na}^+$  e ao mesmo tempo elimine um metabólito (amônia,  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{H}^+$ ), o que auxilia o equilíbrio ácido-base e a eliminação dos resíduos nitrogenados. O sistema  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3^-$  é responsável pela absorção de  $\text{Cl}^-$ . A bomba  $\text{Ca}^{++}$  ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase) e um cotrasportador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  são responsáveis pela absorção do  $\text{Ca}^{++}$  (Baldisserotto, 2006). Como os peixes de água doce produzem urina abundante e extremamente diluída, eles possuem um

rim especializado para a reabsorção de íons, sendo que o excesso de água no organismo é eliminado por osmose através das brânquias (Marshall e Grosell, 2005). Desta maneira, o transporte monovalente de íons da água para o sangue ajuda a manter a homeostase, através da reposição dos íons que foram perdidos para o ambiente.

Os peixes, como todos os organismos aeróbicos, necessitam do oxigênio molecular para os processos metabólicos vitais da vida aeróbica (Martínez-Álvarez et al., 2005). O destino normal da maior parte do oxigênio molecular consumido pelos animais é a redução tetravalente da água, acoplada à oxidação dos alimentos para a produção de energia (Livingstone, 2001). A redução completa do oxigênio ocorre ao nível mitocondrial e produz metabólitos intermediários reativos, chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) (Olszewer, 1995; Fraga et al., 1996; Ferreira e Matsubara, 1997; Martínez-Álvarez et al., 2005).

A principal característica das ROS é a formação de radicais livres. Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas com um elétron não pareado na órbita externa que apresentam alta reatividade e tendência a se ligar a um elétron não pareado próximo, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (Olszewer, 1995; Fraga et al., 1996; Martínez-Álvarez et al., 2005). As ERMO englobam os radicais livres e também os metabólitos que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada (Ferreira e Matsubara, 1997). Apesar desta diferença, a maior parte da literatura utiliza o termo ROS indistintamente e, portanto, neste contexto estão incluídos os intermediários que não possuem elétrons ímpares não pareados, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Estes intermediários, mesmo não apresentando radical livre, possuem atividade oxidante e capacidade de difusão que permitem classificá-los entre as diversas espécies de oxigênio as quais pertencem os radicais livres.

As ROS são produzidas pela reação entre oxigênio e moléculas oxidáveis (Olszewer, 1995; Fraga et al., 1996; Martínez-Álvarez et al., 2005) ou pelo aumento da produção do estresse oxidativo produzido por poluentes ambientais, originados pelo acúmulo de metabólitos ou produtos tóxicos (Sevgiler et al., 2004; Ahmad et al., 2000). No grupo dos radicais livres estão incluídos o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), o radical peroxila ( $RO_2^\cdot$ ), o radical alcóxila ( $RO^\cdot$ ) e a hidroperoxila ( $HO_2^\cdot$ ). O grupo sem radical inclui o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ácido hipocloroso (HOCl), o oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), sendo que este último é conhecido como

espécie reativa de nitrogênio (RNS) (Halliwell e Gutteridge, 1999). No processo de redução do oxigênio as principais ROS produzidas são o  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e o  $OH^-$  (Fraga et al., 1996; Livingstone, 2001; Martínez-Álvarez et al., 2005).

A reatividade e as propriedades nos diferentes ROS variam consideravelmente, sendo que o  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  são considerados particularmente reativos em meio aquoso, mas o  $OH^-$  é instantaneamente reativo com toda molécula orgânica, e por isso é considerada altamente prejudicial aos organismos (Livingstone, 2001). A produção de ROS está inter-relacionada, pois o  $O_2^-$  é instável no meio aquoso, podendo dismutar-se espontaneamente produzindo  $H_2O_2$  e oxigênio molecular ( $2H^+ + 2 O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ). O  $O_2^-$  pode interagir com o  $H_2O_2$  através da Reação de Fenton e Haber Weiss (Anexo I) que é dependente da presença de um catalisador redox (metais de transição, metais quelantes ou hemoproteínas) e formar  $OH^-$  (Livingstone, 2001; Olszewer, 1995).

Estes radicais podem alterar o equilíbrio metabólico dos tecidos, sendo que a periculosidade do  $O_2^-$  reside no fato dele ser precursor do  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  pode induzir a alterações cromossômicas e pode interagir com o  $O_2$  e formar  $OH^-$ , extremamente reativo (Olszewer, 1995). A interação do  $OH^-$  com a membrana lipídica determina o início de uma reação em cadeia de radicais, causando oxidação lipídica, alterando a organização da membrana (Fraga et al., 1996), interferindo na semipermeabilidade celular e no funcionamento das bombas iônicas (Olszewer, 1995).

Os organismos aeróbicos apresentam defesas antioxidantes para se proteger das ROS e neutralizar os seus efeitos deletérios, retardando ou inibindo a oxidação e mantendo o equilíbrio entre os processos pro-antioxidantes e antioxidantes (Fraga et al., 1996; Halliwell e Gutteridge, 1999; Ahmad et al., 2000; Livingstone, 2001). Em algumas espécies de peixes as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e as enzimas dependentes da glutatona - glutatona peroxidase (GPx) e glutatona reduzida (GR) - apresentam função antioxidante (Rudneva, 1997; Martínez-Álvarez et al., 2005), assim como as vitaminas C, E e K e alguns aminoácidos (Martínez-Álvarez et al., 2005).

As três principais enzimas que previnem a formação de ROS são a SOD, a CAT e a GPx (Fraga et al., 1996). A SOD catalisa a dismutação  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , a GPx reduz o  $H_2O_2$  a água e a CAT decompõe o  $H_2O_2$  em água e  $O_2$ . Apesar da GR não ser citada como uma das principais enzimas da defesa antioxidante ela é importante, porque catalisa a redução da glutatona oxidada para a glutatona reduzida. Os fatores bióticos e abióticos, como a idade, a posição

filogenética, o comportamento alimentar, a concentração do oxigênio dissolvido, a temperatura, a presença de xenobióticos/contaminantes e os fatores endógenos influenciam as defesas antioxidantes (Livingstone, 2001; Martínez-Álvarez et al., 2005). O desequilíbrio entre a formação de ROS/RNS e a produção de defesas antioxidantes cria uma condição conhecida como estresse oxidativo, que surge quando ocorre a redução das defesas antioxidantes ou quando há aumento da produção de ROS/RNS ou ambos (Halliwell e Gutteridge, 1999). Quando os distúrbios favorecem a formação de ROS/RNS forma-se uma condição perigosa para o organismo, pois esses compostos apresentam grande potencial de dano.

Apesar dos estudos realizados e da quantidade significativa de informações produzidas tanto em laboratório quanto em nível de campo, é limitado o conhecimento sobre a regulação dos sistemas antioxidantes, bem como a relação entre o estresse oxidativo, as doenças e o bem-estar em organismos aquáticos.

As respostas das enzimas antioxidantes variam de acordo com as espécies, de acordo com as enzimas e de acordo com o tipo de contaminantes (Livingstone, 2001). Analisando-se diferentes grupos animais, como cobras, sapos, larvas de insetos, focas e tartarugas em ambiente de anóxia/hipóxia, verifica-se o aumento da atividade das principais enzimas antioxidantes, bem como das defesas enzimáticas secundárias e/ou os níveis de glutathione, sendo que estas respostas parecem ser produto das adaptações evolutivas em todos os grupos (Hermes-Lima e Zenteno-Savin, 2002).

O conhecimento básico da fisiologia da resposta ao estresse, e as alterações ambientais para as quais os peixes podem adaptar esta resposta são informações muito importantes. Elas estão associadas à saúde geral dos peixes e podem contribuir para identificar condições de cultivo estressantes. A partir destas informações é possível desenvolver métodos para mitigar os efeitos adversos a saúde dos peixes em condições de cultivo (Wedemeyer, 1996; Lima et al., 2006).

A quantificação dos níveis de estresse em peixes pode ser avaliada através da determinação de parâmetros hematológicos, fisiológicos e bioquímicos (Tavares-Dias et al., 2003; Baldisserotto, 2006).

Os principais parâmetros hematológicos analisados na quantificação dos níveis de estresse são o hematócrito, a hemoglobina, a hemoglobina corpuscular média, o volume corpuscular médio, os eritrócitos, os leucócitos, os trombócitos, os monócitos, os linfócitos, os neutrófilos, os eosinófilos, as células granulocíticas especiais, a



metahemoglobina e o tempo de coagulação. Os principais parâmetros fisiológicos são a glicose, o lactato, o glicogênio, os lipídios, os triglicerídeos, o colesterol, os ácidos graxos livres, as proteínas, os aminoácidos, a contração de amônia e as concentrações iônicas, sendo os íons de cloreto, o sódio, o potássio, o cloro, o magnésio e o cálcio os principais. Os principais parâmetros enzimáticos são as enzimas aspartato aminotransferase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, piruvato quinase hepática, lactato desidrogenase e a lisoenzima e hormonal (Kjartansson et al., 1988; Barcellos et al., 2003; Vijayan et al., 1997; Wagner et al., 1997; Urbinati e Carneiro, 2001; Carneiro e Urbinati, 2001b; Tavares-Dias et al., 2001; Martins et al., 2002,2004; Gomes et al., 2003; Ruane e Komen, 2003; Martinez et al., 2004; Rocha et al., 2004; Fagundes e Urbinati, 2008; Van de Nieuwegiessen et al., 2008). Os principais tecidos utilizados nas análises são o sanguíneo, o plasmático, o branquial, o hepático e o muscular.

O estudo com peixes nativos do Brasil tem aumentando nos últimos anos devido ao crescente interesse pelo cultivo dessas espécies (Crescêncio, 2005), como o dourado, *Salminus brasiliensis*. O dourado pertence à família Characidae e a ordem Characiformes da classe Actinopterygii, apresenta coloração amarelo-dourada no corpo e nadadeiras alaranjadas. Seus exemplares são pouco dóceis e sofrem grande estresse com o manejo, podendo morrer quando capturados em malhadeiras ou mesmo pelo anzol (Meurer et al., 2008). O dourado apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, Alto rio Chaparé e Mamoré (Bolívia), e nas bacias ligadas ao sistema lagunar da Lagoa dos Patos (Froesy e Pauly, 2005). É um peixe reofílico, que habita ambientes lóticos e que possui carne saborosa e características ideais para a pesca esportiva (Barbosa e Zaniboni-Filho, 1990). Atualmente há interesse por esta espécie não apenas pelo seu potencial para a piscicultura, mas também pela preocupação que existe quanto a sua conservação em ambientes naturais, em função da degradação do seu habitat e do grande apelo social despertado, principalmente entre as comunidades ribeirinhas de sua área de distribuição (Weingartner e Zaniboni-Filho, 2005).

*S. brasiliensis* apresenta a cavidade bucal e o tubo digestivo adaptados à predação (hábito alimentar carnívoro, ictiófago). As características da cavidade bucofaringeana, a dentição oral e faringeana, os rastros branquiais e o tubo digestivo (esôfago, estômago, intestino médio e posterior - mucosa e pregas longitudinais, esfíncter e cecos

pilórico) apresentam estruturas semelhantes à maioria dos Characiformes ictiófagos (Rodrigues e Menin, 2006; 2008).

Estudos foram desenvolvidos com *S. brasiliensis* coletados no rio Mogi Guaçu/SP, no alto rio Paraná e na área de influência do reservatório do Lago Manso/MT. Neles foi observado que o hábito alimentar da espécie, nas três áreas estudadas, está diretamente relacionado com a disponibilidade de presas e com a pluviosidade, ocorrendo variações estacionais e espaciais na dieta (Luz-Agostinho, 2008; Esteves e Lobo, 2001; Almeida et al., 1997). No alto rio Paraná foi realizado um estudo de simulação do rendimento por recrutamento, com o objetivo de rever a regulamentação de pesca e tentar conservar os estoques naturais da espécie (Feitosa et al., 2004).

Na área de influência do reservatório do Lago Manso/MT foi avaliada a situação do equilíbrio populacional e estimadas a idade, o crescimento e a determinação da maturação das gônadas a partir de anéis de crescimento presentes nas escamas (Barbieri et al., 2001; 2004). Também foi determinada a variação da concentração energética muscular em diferentes estágios de desenvolvimento gonadal (Espínola et al., 2008) e o acúmulo temporal de mercúrio nos tecidos (Hylander, et al., 2006; Tuomola et al., 2008). Exemplares coletados neste local apresentaram alterações histopatológicas hepáticas causadas por um nematóide *Neocucullanus neocullanus* (Veiga, 2009). Na região central do Pantanal mato-grossense os exemplares apresentaram o parasita (*Myxobolus salminus*) nas suas brânquias (Adriano et al., 2009).

No alto rio Uruguai *S. brasiliensis* não apresentou segregação sexual, mas foi observado que as fêmeas alcançaram comprimento maior que os machos. O período reprodutivo ocorre na primavera-verão, coincidindo com as maiores temperaturas da água e antecedendo o período de chuvas. O estudo histomorfológico das gônadas sugere desova total. Apesar da construção de duas barragens no alto rio Uruguai (Itá e Machadinho), há atividade reprodutiva da espécie na área de abrangência dos empreendimentos, mas não o suficiente para garantir a sobrevivência da espécie na região (Machado, 2003).

Os dados disponíveis sobre o crescimento em condição de cativeiro revelaram que *S. brasiliensis* apresenta maior crescimento na fase inicial de cultivo, principalmente no primeiro trimestre de vida, quando atinge peso médio de 267g e comprimento total de 211 mm (Barbosa e Zaniboni-Filho, 1990). Os alevinos estocados em viveiros de terra na densidade de 0,67 peixes m<sup>-2</sup>, em dois locais diferentes, apresentaram ganho de peso diário reduzido (0,46 e 0,51) e altas taxas de conversão alimentar altas (3,52 e 3,82) (Fracalossi et al., 2004).

Avaliando-se diferentes densidades de estocagem com o objetivo de reduzir o canibalismo em alevinos ( $5,68 \pm 0,47\text{g}$ ) o melhor resultado foi obtido na densidade de 115 peixes  $\text{m}^{-3}$  (Machado, 2004). Entretanto, em juvenis ( $106,57 \pm 26,47\text{g}$ ) dessa mesma espécie, as densidades de 55, 85, 115 e 140 peixes  $\text{m}^{-3}$  não influenciaram o desempenho dos peixes cultivados em sistema intensivo de produção (Dairiki et al., 2006).

Estudos da fase larval indicaram que *S. brasiliensis* esgota o saco vitelínico no terceiro dia, período em que as larvas ficam dispersas na coluna de água, sem se agrupar no fundo da estrutura de cultivo (Santos e Godinho, 2002). Após a eclosão, Vega-Orellana et al. (2006) demonstraram a importância do fornecimento de alimentos vivos, como larvas de *Prochilodus lineatus*, sendo que as de menor tamanho são as mais indicadas (Bernal Sánchez, 2006). A preferência alimentar por alimentos vivos é pelo grupos dos cladóceros, em relação aos demais grupos zooplancônicos (Mai, 2004), sendo que até o quinto dia após a eclosão são consumidores generalistas, com tendência a se especializar em alguns itens (Ribeiro, 2005; Ribeiro e Nuñez, 2008).

Por apresentar hábito alimentar carnívoro, a base de peixes e crustáceos (Froesy e Pauly, 2005) é uma espécie que exige altos níveis de proteína nas dietas (Borghetti, 1990). Recomenda-se a inclusão de pelo menos 58% de proteína bruta na formulação de dietas para alevinos (0,75 g e 3,18 g), para ração com concentração energética de 4.376 kcal/kg (Teixeira, 2006). Na formulação das rações para esta espécie, a farinha de peixe pode ser substituída, parcialmente, pela farinha de víscera de frango, farelo de soja e farinha de glúten de milho (Borghesi et al., 2008).

A alimentação com alimentos formulados deve ser fornecida de forma gradual, após o quinto dia, pois neste período o estômago ainda não é funcional (Vega-Orellana et al., 2006). A visão e o sistema mecanorreceptor estão envolvidos na captura das presas (Bernal Sánchez, 2006) e, sendo assim, ambientes contaminados com produtos químicos, como componentes do óleo bruto, que prejudicam a visão da espécie, interferem na atividade de forrageamento das larvas e podem afetar o recrutamento da espécie em ambiente natural (Carvalho et al., 2008).

Experimentos de cultivo em tanques-rede revelaram que a espécie apresenta sobrevivência e crescimento semelhante quando mantida em densidades entre 10 e 30 peixes  $\text{m}^{-3}$ , em tanques circulares ou quadrados (Beux et al., 2008). Estes autores observaram maior crescimento e sobrevivência quando os peixes foram cultivados em tanques de maior

volume ( $8\text{m}^3$  versus  $4\text{m}^3$ ) e submetidos a manuseio reduzido (a cada 180 dias versus a cada 60 dias).

O cultivo de larvas desta espécie em tanques externos deve ser realizado após um período mínimo de quatro dias de larvicultura intensiva em condições controladas (Mai, 2004; Mai e Zaniboni-Filho, 2005). O canibalismo, apesar de ser um comportamento característico da espécie em laboratório, não foi registrado por Ribeiro (2005) em viveiros de terra ( $810\text{ m}^2$ ,  $900\text{ m}^2$  e  $1480\text{ m}^2$ ) estocados com larvas na densidade de  $30$  pós-larva  $\text{m}^{-2}$ .

Estudos indicam que o fotoperíodo, associado ao tipo de alimento também interfere no desenvolvimento das larvas de dourado. Há aumento no canibalismo e redução na sobrevivência das pós-larvas alimentadas com náuplios de artêmia cultivados com luminosidade de 24 horas, com 14 horas de luz e 10 horas de escuridão e na ausência de luz. Porém, fornecendo larvas forrageiras como alimento o melhor crescimento foi observado na ausência de luz (Schütz, 2003; Schütz e Nuñez, 2007).

Algumas características do metabolismo foram estudadas nesta espécie. Os estudos indicaram que o tempo de coagulação sanguínea varia de 56 a 472 segundos e o valor médio do hematócrito é  $40,5 \pm 1,7\%$  (Ranzani-Paiva et al., 2000). A concentração letal ( $\text{Cl}_{50}$ ) para o oxigênio dissolvido (OD) varia de  $0,66$  a  $0,75\text{ mg L}^{-1}$  de OD, com 24 e 96 h, respectivamente. Neste mesmo período, a  $\text{Cl}_{50}$  para amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) variou de  $1,89$  a  $1,83\text{ mg NH}_3\text{ L}^{-1}$  (Gazzola, 2003). Neste estudo verificou-se que o melhor crescimento foi obtido com concentração de  $\text{NH}_3$  em torno de  $0,0014\text{ mg NH}_3\text{ L}^{-1}$  e valores de OD acima de  $5,04\text{ mg L}^{-1}$ . *S. brasiliensis* é uma espécie muito suscetível a combinação de elevada concentração de amônia com baixa concentração de OD, apresentando melhor desempenho em crescimento com elevados valores de OD (Serafini, 2005). A exposição crônica a  $\text{NH}_3$  ( $0,13$ ;  $0,24$  e  $0,46\text{ mg NH}_3\text{ L}^{-1}$ ) não influenciou o índice hepatossomático e o Ht, mas alterou a atividade das aminotransferases plasmáticas, indicando que o dourado atinge uma nova homeostase na concentração de  $0,46\text{ mg NH}_3\text{ L}^{-1}$  (Streit, 2006). Em relação à formação de ácido láctico a espécie é considerada "não liberadora" de lactato (Moraes et al., 2004). O lactato no sangue de salmonídeos após natação intensa aumentou sua concentração por 8-10 vezes, quando comparada a do catfish (Milligan & Girard, 1993). Esta concentração representa 10% a 20% do lactato total, o que classifica esta espécie como "liberadora" de lactato (Wood & Perry, 1985 apud Moraes et al., 2004), em contraste com os "não liberadores", como *Pleuronectes platessa* L. (Wardle, 1978).

Também foram desenvolvidos estudos avaliando métodos e tecnologias para manter e aumentar a diversidade genética desta espécie. Foram desenvolvidas técnicas para o melhoramento na incubação, maximização do uso de machos, avaliação da qualidade do esperma (motilidade, concentração e vigor espermático), taxas de fertilização, patologias e criopreservação (Viveiros e Godinho, 2009; Streit Jr., 2008; Carolsfeld et al., 2003). As análises do DNA de espermatozóides de *Salminus* e *Brycon* sugerem que as subfamílias têm uma origem monofilética (Veríssimo-Silveira et al., 2006).

Todos estes estudos contribuem para a determinação das condições adequadas para cultivo de peixes. No entanto, muitas informações estão ainda incompletas ou indisponíveis.

Deste modo o presente estudo teve por objetivo avaliar o crescimento e as respostas fisiológicas relacionadas ao estresse e as respostas ao estresse secundário de alevinos de dourado submetidos aos agentes estressores densidade e manuseio periódico.



## Capítulo I

Artigo publicado na revista *Aquaculture*, 301: 22-30, 2010.

### **Crescimento e respostas bioquímicas e fisiológicas de *Salminus brasiliensis* em diferentes densidades de estocagem e manuseio**

Neiva Braun<sup>1,4</sup>, Alcir Luiz Dafré<sup>2</sup>, Ronaldo Lima de Lima<sup>1,4</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>3</sup>, Alex Pires de Oliveira Nuñez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura/ Universidade Federal de Santa Catarina; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas/Universidade Federal de Santa Catarina; <sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia/Universidade Federal de Santa Maria; <sup>4</sup>Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aqüicultura/Universidade Federal de Santa Catarina

#### **Resumo**

O dourado *Salminus brasiliensis* é uma espécie de peixe de água doce encontrada nos rios da América do Sul e que apresenta potencial para ser criado comercialmente. Considerando que a densidade de estocagem e o manuseio são conhecidos agentes estressores na criação de peixes, estudou-se o efeito combinado da densidade de estocagem (30, 150 e 300 peixes m<sup>-3</sup>) e do manuseio no crescimento, bem como nas respostas fisiológicas e bioquímicas de alevinos de *S. brasiliensis*. Os parâmetros mensurados foram: comprimento padrão e peso, hematócrito no sangue (Ht) e hemoglobina ([Hb]), glicose e lactato, atividades das enzimas hepática antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona-S-transferase (GST), catalase (CAT) e as concentrações de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e Ca<sup>2+</sup> no plasma e nas brânquias de alevinos de *S. brasiliensis*. As coletas de material biológico foram realizadas a cada 20 dias até o final do experimento, aos 80 dias. Os alevinos de *S. brasiliensis* dos tratamentos sem manuseio apresentaram crescimento reduzido com o aumento da densidade. Em contraste, os peixes com manuseio apresentaram um crescimento mais lento em todas as densidades, sugerindo que o efeito do manuseio foi maior do que o efeito da densidade de estocagem. As enzimas relacionadas ao estresse oxidativo foram influenciadas pelo manuseio, indicando que o estresse é um modulador importante da resposta antioxidante. As defesas antioxidantes foram influenciadas negativamente pelo manuseio, mas pouco influenciada pela densidade de estocagem. Aos 80 dias, a [Hb], a atividade enzimática da GR, GST, CAT e GPx no fígado e as concentrações de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nas brânquias foram maiores nos peixes que

não tinham sido manuseados, em contraste com a concentração de glicose, que foi maior nos peixes manuseados. No entanto, a atividade da GPx foi influenciado pela densidade de estocagem nos tratamentos com manuseio. O Ht e as concentrações de lactato,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático não foram influenciados pelos fatores estressores manuseio/densidade de estocagem. O crescimento de *S. brasiliensis* foi afetado negativamente pelo estresse causado pela frequência de manuseio.

Palavras-chave: estresse, defesas antioxidantes, íons, hematologia

## 1. Introdução

As respostas bioquímicas dos organismos diante de estímulos agressivos ou ameaçadores causadores de estresse são controladas pelos sistemas nervoso e endócrino que modificam as condições fisiológicas dos peixes para manter a sua homeostase corporal. Estas respostas apresentam um limite de tolerância, que depende da espécie considerada, do tipo e da intensidade do agente estressor e do tempo que o organismo permanece sob o seu efeito (Moraes e Martins, 2004). Na fase inicial essas respostas são chamadas de adaptativas, e sua função é contribuir para a superação do efeito dos distúrbios estressores para a recuperação da homeostase. Elas podem ainda ser classificadas como primárias quando produzem mudanças endócrinas, como a alteração das concentrações das catecolaminas e dos corticosteróides, ou secundárias, quando produzem mudanças nas características relacionadas ao metabolismo, no balanço hidromineral, cardiovascular e respiratório, e nas funções imunológicas (Barton, 2002).

O estresse pode causar alterações de alguns parâmetros hematológicos, como o número de células vermelhas e a concentração de hemoglobina, que podem aumentar, propiciando maior oxigenação do sangue (Aota et al., 1990) e elevando o suprimento de energia aos tecidos (Urbinati e Carneiro, 2004). O estresse também causa aumento da liberação de catecolaminas e corticosteróides, o que aumenta a pressão sanguínea e promove vasodilatação nas brânquias, o que aumenta o fluxo de sangue para as lamelas e altera o fluxo de íons neste órgão (Sundin, 1999).

Além disso, o estresse também se manifesta na forma oxidativa a partir do acúmulo de metabólitos ou produtos tóxicos que podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Ahmad et al., 2000; Sevçiler et al., 2004). Essas espécies, que produzem danos aos



componentes e às funções celulares, são balanceadas pela produção de antioxidantes, que têm a função de neutralizar seus efeitos deletérios (Ahmad et al., 2000).

As enzimas catalase, superóxido dismutase e as enzimas dependentes da glutatona, como a glutatona peroxidase, apresentam função antioxidante (Ahmad et al., 2000; Sevgiler et al., 2004), inclusive nos peixes (Rudneva, 1997). As defesas antioxidantes não-enzimáticas, tais como as vitaminas C, E e K, e alguns peptídeos (glutatona) e aminoácidos, também são importantes na interceptação e na neutralização das espécies reativas de oxigênio (Martínez-Álvarez et al., 2005).

Algumas estratégias e procedimentos comuns na rotina da piscicultura, como a variação na densidade de estocagem e o manuseio podem causar estresse aos peixes. A densidade de estocagem está diretamente ligada ao conforto dos animais e à produtividade do cultivo, podendo vir a ser um fator determinante no rendimento econômico da produção. A densidade ideal é aquela que não provoca redução substancial nas taxas de crescimento e na qualidade ambiental (Van de Nieuwegiessen et al., 2008). Segundo Chatterjee et al. (2006), a densidade tem efeito marcante no metabolismo, no crescimento e no estresse associado ao cativeiro, sendo que sua variação é espécie-específica. Outro fator estressor na criação de peixes é o manuseio dos animais, que envolve a perseguição, a captura e a exposição dos peixes ao ar (Urbinati e Carneiro, 2004).

Apesar da importância da identificação e o controle do estresse para assegurar o bem-estar e crescimento de peixes em cativeiro, poucos são os estudos avaliando esses problemas com as espécies nativas na América do Sul (Rocha et al., 2004; Brandão et al., 2006).

Desse modo o presente estudo teve por objetivo avaliar o crescimento, as respostas fisiológicas e as defesas antioxidantes de juvenis de *S. brasiliensis* quando expostos aos agentes estressores densidade de estocagem e manuseio.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Animais e agentes estressores**

Os alevinos de dourado (*S. brasiliensis*) utilizados no experimento foram obtidos de desovas induzidas de reprodutores selvagens coletados na natureza, na bacia do alto rio Uruguai.

Os agentes estressores testados foram a densidade de estocagem e o manuseio, que consistiu na perseguição, captura e

exposição dos peixes ao ar por um período de 30 s a cada 20 dias por um período de 80 dias.

## 2.2. Desenho experimental

Os fatores densidades de estocagem e manuseio de peixes foram usados num modelo fatorial distribuído em um delineamento casualizado, com três repetições. As densidades 30, 150 e 300 m<sup>-3</sup> são equivalentes a 0.24, 1.17 e 1.70 kg m<sup>-3</sup> nos tratamentos com manuseio e 0.18, 0.94 e 2.28 kg m<sup>-3</sup> nos tratamentos sem manuseio. O experimento foi conduzido pelo período de 80 dias em tanques com capacidade de 1000 litros, ligados a um sistema de recirculação de água com temperatura constante (25.6 ± 1.7°C), aeração contínua e filtro mecânico e biológico, com exposição a fotoperíodo controlado no regime 12:12 horas de luz e escuro. Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada contendo 42 % de proteína bruta, oferecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente.

Semanalmente foram monitoradas as concentrações de oxigênio dissolvido, de amônia total (Koroleff, 1983) e não-ionizada, a temperatura e o pH da água (multiparâmetro HACH), que apresentaram, respectivamente, os seguintes valores médios (± desvio padrão): 6.84 (± 0.75), 0.14 (± 0.1) e 0.0006 (± 0.00) mg L<sup>-1</sup>; 25.6 (±1.8) °C e 6.9 (±0.2).

## 2.3. Sobrevivência e crescimento

Foram avaliadas a sobrevivência (%) e o crescimento através do peso médio final (g), média de comprimento padrão (cm), biomassa final (kg) ([soma do peso de cada peixe no dia número 80/final de peixe] • número inicial de peixes), consumo de ração alimentar diária (total fornecido / número de dias / número de peixes) e taxa de conversão alimentar (ração total fornecido / [biomassa final - biomassa inicial]). Nos peixes com manuseio, o consumo alimentar diário e conversão alimentar foram estimados a cada 20 dias e calculada uma média única.

## 2.4. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos

As coletas de material biológico nos tratamentos com manuseio foram periódicas, a cada 20 dias até os 80 dias. Após esta prática, o volume de água nos tanques foi reduzido, mantendo as densidades de estocagem dentro dos níveis avaliados. Nos tratamentos sem manuseio a coleta foi realizada aos 80 dias. O material coletado foi utilizado na

análise dos diversos parâmetros hematológicos, enzimáticos e iônicos. Foi coletado material biológico de nove indivíduos por tratamento. A água amostrada foi coletada a partir do meio da coluna de água a cada 20 dias, nos tanques com manuseio, antes do manejo e aos 80 dias nos tanques sem manuseio.

O sangue foi obtido a partir do puncionamento da veia caudal, com seringa heparinizada (Heparin-Cristália, SP/Brasil), sendo o mesmo armazenado em microtubos de 1,5 ml, acondicionados em gelo picado. Uma alíquota do sangue foi utilizada nas análises do hematócrito e da hemoglobina. Outra alíquota foi centrifugada (3000 x g/5 minutos) para a obtenção do plasma e estocado em geladeira para as análises de glicose e lactato. Posteriormente foi conservado em nitrogênio líquido para a análise da concentração dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Os tecidos hepático e branquial também foram conservados em nitrogênio líquido. O tecido hepático foi lavado com solução NaCl 0,9% e utilizado nas análises das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase e catalase. O tecido branquial foi utilizado nas análises dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . O sangue foi centrifugado por 5 minutos em tubos capilares em microcentrífuga (EVLAB, PR/Brasil) para a obtenção do hematócrito (Ht). A concentração de hemoglobina ([Hb]) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (Van Kampen e Zijlsta, 1964), onde foram diluídos 20  $\mu\text{l}$  de sangue em 1.0 ml da solução Drabkin antes da leitura fotométrica em 540 nm.

A glicose e o lactato foram determinados com kits de análise da Biotécnica (Varginha, MG/Brasil) e Kovalente (São Gonçalo, RJ/Brasil), respectivamente, seguindo as instruções dos fabricantes. A concentração de íons  $\text{Cl}^-$  no plasma e nas brânquias foi determinada de acordo com Zall et al. (1956) e as concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  em fotômetro de chama (Micronal B260, SP/Brasil). Os procedimentos foram similares para a análise no plasma e nas brânquias, exceto a adição do ácido nítrico 2N na proporção de 3 ml por g de tecido ao tecido branquial. Este material foi incubado a 70°C por 48 horas em estufa e o sobrenadante foi retirado para as análises. Os dados da glicose aos 20 dias e dos íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  aos 60 dias não estão disponíveis devido a problemas técnicos.

Nas análises enzimáticas, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 ml de Tampão HEPES 20 mM pH 7.0 e centrifugado (20000 x g/20 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi retirado para as análises enzimáticas (glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione reductase e catalase) que foram determinadas pelos

métodos descritos por Wendel (1981), Habig et al. (1981), Carlberg e Mannervik (1985) e Aebi (1984), respectivamente. Resumidamente, a atividade da GPx foi mensurada através da medição do consumo inespecífico de NADPH a 340 nm ao longo do tempo. O consumo não-específico de NADPH foi subtraído da variação da absorbância e os dados padronizados pela concentração de proteína, sendo expressa em nmol/min/mg de proteína. A atividade da GST foi mensurada da mesma forma e as taxas de conjugação espontânea entre GSH e CDNB foi subtraída do delta de absorbância obtido e os dados padronizados pela concentração de proteína, sendo expressa em nmol/min/mg de proteína. A atividade da GR também foi medida pelo monitoramento do consumo de NADPH a 340 nm, padronizado pelo teor de proteína e expresso nmol/min/mg de proteína. A atividade da CAT foi mensurada utilizando um meio de reação contendo KPi 0.05 M, pH 7.0; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM e Triton X100 0.01%. Após 45 segundos, a variação da absorbância foi determinada a 240 nm para medir o consumo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O consumo inespecífico de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi subtraído do delta de absorbância obtido, padronizado com o teor de proteína e expresso nmol/min/mg de proteína.

A concentração de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (1976) usando-se albumina de soro bovino como padrão.

### 2.5. Análise estatística

As variáveis de crescimento, bioquímicas e fisiológicas foram avaliadas pela análise de regressão (Zar, 1996), ao nível de significância de 5,0%. Na comparação das regressões nas diferentes densidades de estocagem com as diferentes variáveis, foi aplicada a análise de covariância (Zar, 1996).

## 3. Resultados

Ao final de 80 dias o peso final dos peixes foi acentuadamente maior nos grupos sem manuseio, sendo que o peso médio dos peixes desse grupo foi sempre superior aos do grupo com manuseio para todas as densidades avaliadas. O peso final foi ligeiramente influenciado pela densidade de estocagem no grupo tratado com manuseio, enquanto nos peixes sem manuseio houve uma acentuada redução do peso com o aumento da densidade (Fig. 1A). O comprimento padrão e o consumo alimentar diário aparente diminuíram com o aumento da densidade nos tratamentos, independentemente do manuseio periódico (Fig. 1B e 1C), sendo que os maiores valores foram encontrados na ausência de manuseio. A biomassa final foi sempre mais elevada no grupo sem

manuseio, no entanto, ao contrário dos outros parâmetros, o aumento da biomassa foi correlacionado com o aumento da densidade (Fig. 1D). A conversão alimentar foi marcadamente maior nos grupos com manuseio, entretanto este parâmetro não sofreu influência da densidade (Fig. 1E).

Não houve mortalidade nas densidades 30 e 150 peixes  $m^{-3}$ , enquanto que na densidade 300 peixes  $m^{-3}$  a sobrevivência foi ligeiramente afetada (97,2 % com manuseio e 93,1% sem manuseio).

Nos peixes com manuseio a atividades iniciais de GR e GST (Fig. 2A e 2B) foram alta aos 20 dias e diminuiu drasticamente ao longo do tempo. Para estas duas variáveis, a influência da densidade foi observada apenas no dia 20. A GPx mostrou o padrão oposto de atividade, como atividade inicial foi baixa ao dia 20, aumentando até o dia 60, período em que não foi observada a influência da densidade de estocagem (Fig. 2C). Os níveis de glicose foram maiores nos dias 40 e 60 em relação ao dia 80, mas foi observada a influência da densidade sobre esta variável (Fig. 2D). A concentração de hemoglobina apresentou ligeira variação com o aumento da densidade, em todas as coletas (Fig. 2E) e uma tendência de aumento ao longo do tempo, similar ao hematócrito (Fig. 2F). A concentração de lactato (Fig. 2G) e atividade de catalase (Fig. 2H) apresentaram valores alternando ao longo do tempo, sendo que a densidade apresentou influência mais acentuada no lactato.

As concentrações de íons na água e nas brânquias dos peixes apresentaram variação temporal. As concentrações de  $Na^+$  e  $Cl^-$  nas brânquias (Fig. 3A e 3B) aumentaram ao longo do tempo, enquanto que na água os íons apresentaram o padrão oposto (Fig. 3C e 3D). As concentrações de  $K^+$  nas brânquias foram reduzidas até dia 60, aumentando posteriormente (Fig. 3E), mostrando a influência da densidade ao longo do tempo. As concentrações de  $Ca^+$  nas brânquias (Fig. 3F) aumentaram ao longo do tempo. Para esses íons, a baixas concentrações registradas na água até o dia 40 contrastou com o aumento marcante no dia 60, e as concentrações permaneceram elevados até o dia 80 para as densidades de 30 e 150  $m^{-3}$  (Fig. 3G e 3H).

O manuseio teve um efeito distinto nas respostas fisiológicas e bioquímicas em *S. brasiliensis*, uma vez que a atividade hepática das enzimas antioxidantes (GR, GPx e GST e CAT), a [Hb] e as concentrações de  $Na^+$  e  $Cl^-$  nas brânquias foram menores do que em peixes sem manuseio (Fig. 4A-4C, 4E-4H). A atividade da GPx aumentou com a densidade apenas no grupo com manuseio (Fig. 4C). As concentrações de glicose foram diminuindo com o aumento da

densidade de estocagem, mas aos 80 dias esses valores não foram afetados pelo manuseio (Fig. 4D).

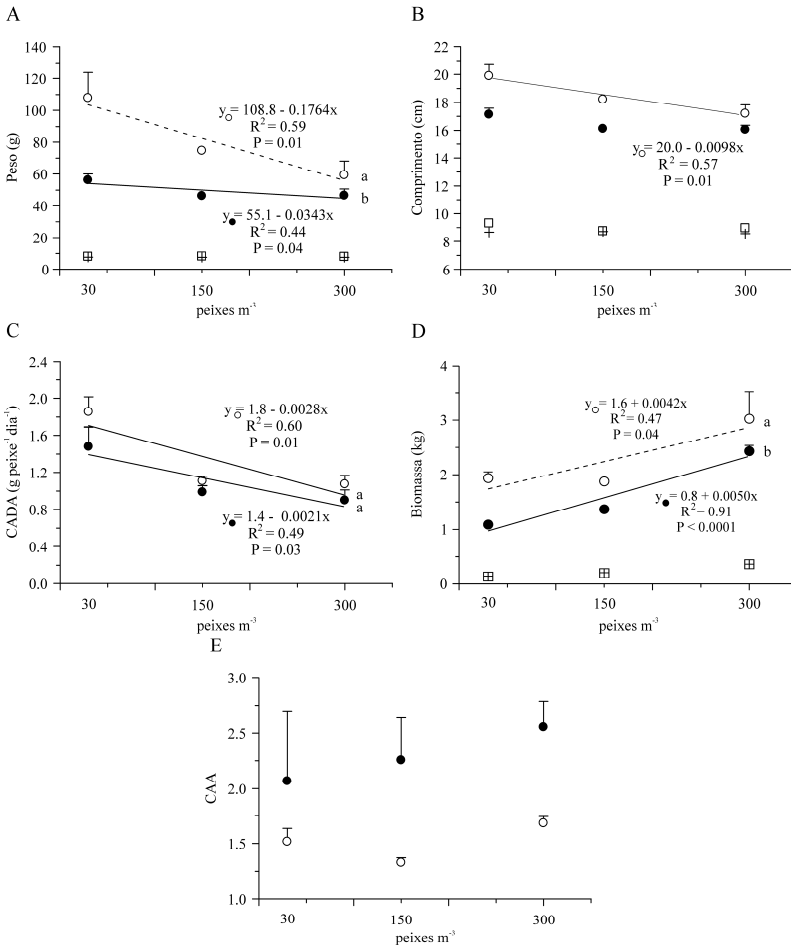


Figura 1. Desempenho de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades de estocagem na presença (círculo fechado) e ausência (círculo aberto) de manuseio aos 80 dias. (A) peso, (B) comprimento padrão, (C) consumo alimentar diário aparente, (D) biomassa e (E) conversão alimentar aparente. Peso e o comprimento padrão inicial dos peixes cultivados na presença (+) ou ausência do manuseio (○). As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam significados diferentes ( $P < 0,05$ ) entre o coeficiente de regressão para peixes manuseados (círculo fechado) ou não manuseados (círculo aberto).

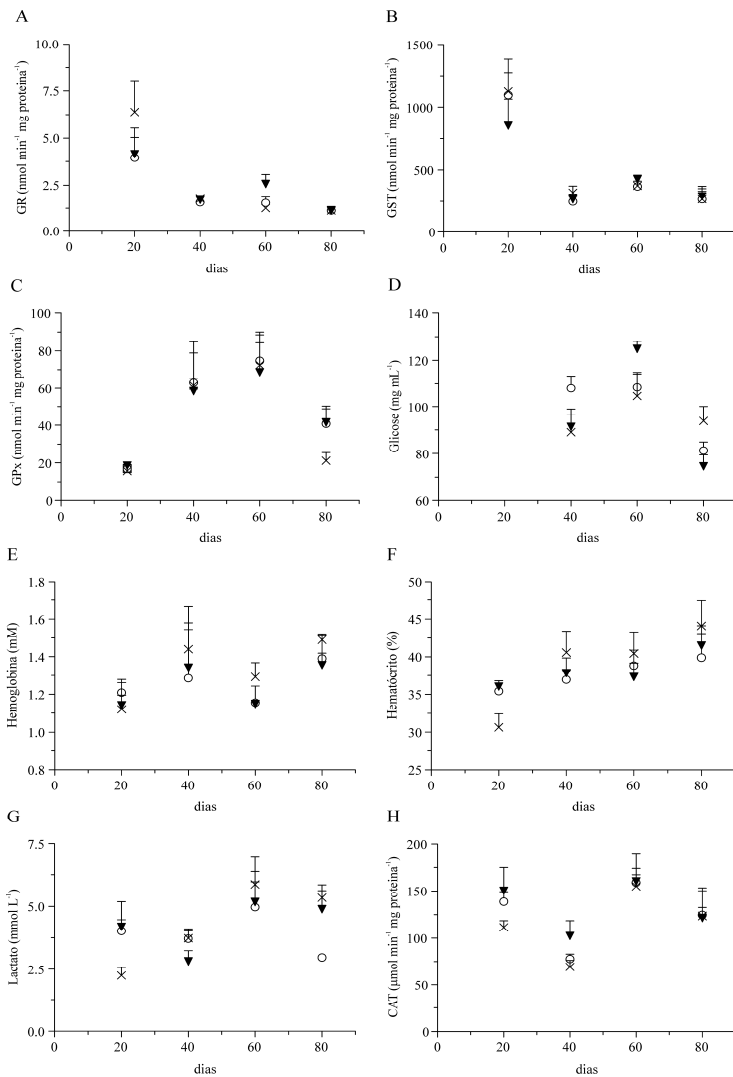


Figura 2. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades de estocagem nos tratamentos com presença de manuseio aos 20, 40, 60 e 80 dias. Atividade da (A) glutatona redutase (GR), (B) da glutatona-S-transferase (GST), (C) glutatona peroxidase (GPx), (D) concentração da glicose plasmática, (E) hemoglobina, (F) hematócrito, (G) lactato plasmático e (H) atividade da catalase. Densidade de estocagem: 30 (×), 150 (○) e 300 m<sup>-3</sup>. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média.

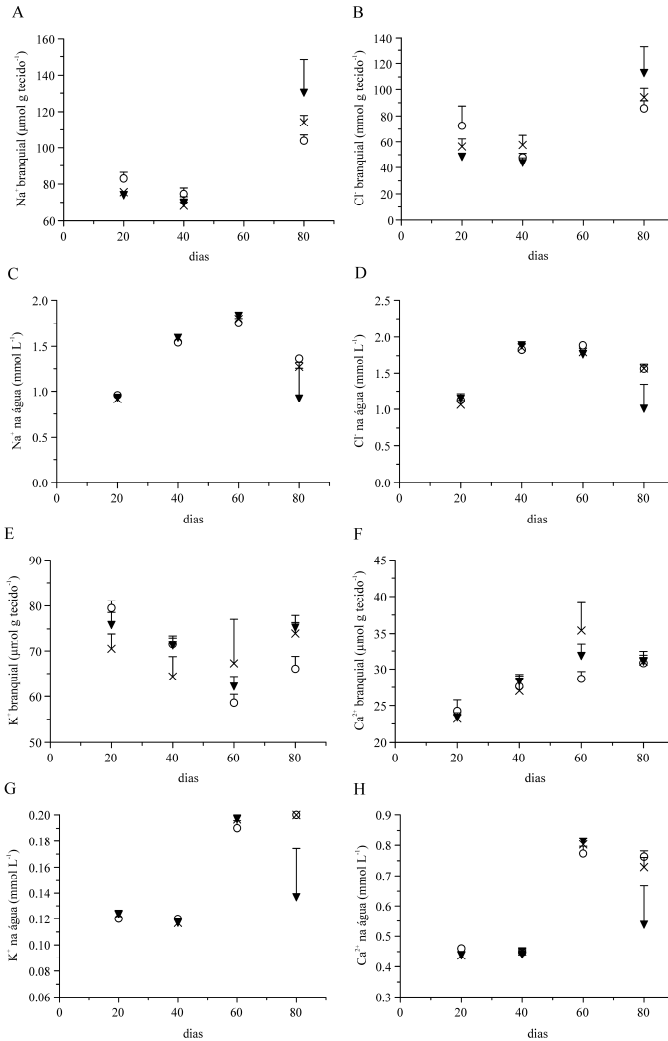


Figura 3. Concentrações de íons nas brânquias de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades na presença de manuseio. Concentrações de íons nas brânquias: (A) Na<sup>+</sup>, (B) Cl<sup>-</sup>, (E) K<sup>+</sup>, (F) Ca<sup>2+</sup>. Concentrações de íons na água: (C) Na<sup>+</sup>, (D) Cl<sup>-</sup>, (G) K<sup>+</sup>, (H) Ca<sup>2+</sup>. Densidade de estocagem: 30 (x), 150 (o) e 300 (•) m<sup>-3</sup>. As linhas acima dos símbolos representam o desvio da média.



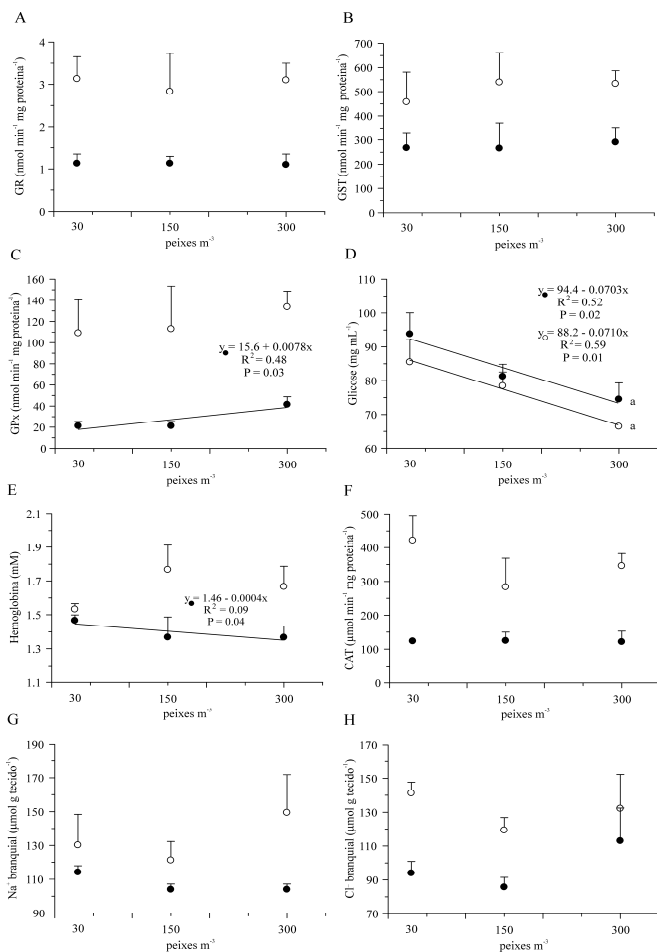


Figura 4. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de alevinos de *Salminus brasiliensis* cultivados em diferentes densidades de estocagem nos tratamentos com manuseio aos 80 dias. Atividade da (A) glutatona redutase (GR), (B) glutatona-S-transferase (GST), (C) glutatona peroxidase (GPx), (D) concentração da glicose plasmática, (E) hemoglobina, (F) atividade da catalase, (G) concentração Na<sup>+</sup> branquial e (H) Cl<sup>-</sup> branquial. Letras iguais indicam significados similares ( $P < 0,05$ ) entre os coeficientes de regressão de peixes cultivados na presença (círculo fechado) e ausência (círculo aberto) de manuseio. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média.

Alguns parâmetros não mostraram qualquer relação com fatores de estresse ou com variação temporal e, portanto, são representados por sua média geral (Tabela 1).

Tabela 1. Hematócrito (Ht), hemoglobina ([Hb]) e íons teciduais de *Salminus brasiliensis* e da água de cultivo. Os valores foram calculados para todo o período de estudo (20, 40, 60 e 80 dias). A composição iônica da água de cultivo foi avaliada ao final do experimento (80 dias). Os dados são apresentados com as médias  $\pm$  desvio padrão, n = número de amostras, M = peixes manuseados, SM = peixes sem manuseio.

Parâmetro	Manuseio	Brânquias ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ) (n=50)	Plasma ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Sangue	Água ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) (n= 18)
<i>Período Total</i>					
Ht (%)	M	-	-	38,3 ( $\pm$ 4,7) (n=36)	-
[Hb] (mM)	M	-	-	1,3 ( $\pm$ 0,8) (n=36)	-
<i>Dia 80</i>					
Lactato ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	SM	-	4,3 ( $\pm$ 1,8) (n=50)	-	-
Na <sup>+</sup>	M, SM	-	257,9 ( $\pm$ 33,6) (n= 34)	-	1,2 ( $\pm$ 0,2)
Cl <sup>-</sup>	M, SM	-	137,0 ( $\pm$ 39,4) (n= 34)	-	1,5 ( $\pm$ 0,02)
K <sup>+</sup>	M, SM	73,0 ( $\pm$ 6,7)	7,3 ( $\pm$ 1,9) (n=25)	-	0,2 ( $\pm$ 0,3)
Ca <sup>2+</sup>	M, SM	31,3 ( $\pm$ 3,1)	1,1 ( $\pm$ 0,2) (n=11)	-	0,7 ( $\pm$ 0,1)

#### 4. Discussão

O crescimento de *S. brasiliensis* foi influenciado negativamente pelo manuseio, uma vez que o peso, o comprimento e a biomassa foram menores nesse grupo de peixes, que também apresentou alta conversão alimentar. Neste grupo, o peso e o comprimento-padrão não se alteraram com a densidade, o que evidenciou que o estresse associado ao manuseio superou o efeito adverso da densidade. Essa condição pode também estar relacionada à redução do consumo de alimento nos peixes manejados, uma vez que após o manuseio os animais não consumiam alimento pelo período de 2-3 dias. O manuseio também pode quebrar a organização hierárquica entre os peixes (Barcellos et al., 1999),

causando estresse adicional que pode ser compensado por processos adaptativos, como a realocação da energia (Mommsen et al., 1999), que reduz o crescimento.

Nos tratamentos sem manuseio periódico os peixes apresentaram crescimento superior, porém o aumento da densidade causou redução do peso, do comprimento e do consumo alimentar diário aparente, mas apresentou maior biomassa. Resultado similar ao registrado em juvenis de *Dicentrarchus labrax* nas densidades 80 a 650 m<sup>-3</sup> (Papoutsoglou et al., 1998), *Diplodus sargus* nas densidades de 113 a 396 peixes m<sup>-3</sup> (Papoutsoglou et al., 2006) e para o jundiá *Rhamdia quelen* cultivado em tanques-redes nas densidades de 35 a 140 peixes m<sup>-3</sup> (Weingartner et al., 2008). Wang et al. (2000) observaram redução do consumo alimentar e da taxa de crescimento com o aumento da densidade em *Lepomis* sp., indicando que o aumento na atividade e o estresse de interação social causaram redução do crescimento na densidade mais baixa, enquanto a redução do consumo de alimento foi responsável pela redução do crescimento na densidade mais elevada.

A variação nas atividades de enzimas antioxidantes hepáticas em *S. brasiliensis* reflete a influência do estresse de manejo e o tempo de aplicação deste fator estressor. A GR, GST e GPx tem papel importante na defesa contra as espécies reativas de oxigênio, especialmente os superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais hidroxila, que são radicais intermediários produzidos no ciclo redox (Olszewer, 1995; Ahmad et al., 2000). Quando os níveis de espécies reativas de oxigênio aumentam, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes para eliminar os radicais livres (Di Giulio et al., 1989; Storey, 1996). A alta atividade da GST e GR em *S. brasiliensis* no dia 20 pode ser uma resposta fisiológica do peixe para eliminar os radicais produzidos em resposta ao manuseio. A redução da atividade destas enzimas ao longo do tempo pode representar uma resposta fisiológica do organismo aos agentes estressores manuseio e densidade de estocagem. A deteriorização funcional das células é derivada do acúmulo de danos oxidativos causados pela não remoção de intermediários reativos em lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (Martínez-Álvarez et al., 2005).

A influência do agente estressor manuseio na atividade de enzimas antioxidantes em *S. brasiliensis* tornou-se mais evidente aos 80 dias, quando as enzimas hepáticas relacionadas ao estresse oxidativo (GR, GST, CAT e GPx) apresentaram menor atividade no grupo com manuseio. Isso é uma resposta ao estresse contínuo da densidade de estocagem e manuseio, o que pode prejudicar a atividade das enzimas antioxidante ou causada pelos danos cumulativos nessas enzimas. Os

estudos sobre resíduos industriais, metais pesados e pesticidas, mostram que a atividade das enzimas antioxidantes varia entre as espécies de peixes, sendo que a atividade de algumas destas enzimas são dependentes no tempo e do agente estressor. Assim, verificou-se que *Oncorhynchus mykiss* apresentou redução temporal na atividade da GPx (Miller et al., 2007), enquanto *Channa punctatus* mostrou um aumento temporal na atividade da GPx, GST, CAT e GR (Ahmad et al., 2000) e *Oreochromis niloticus* não mostrou nenhuma mudança temporal na atividade da GPx e CAT (Sevgiler et al., 2004).

O grupo com manuseio mostrou relação positiva entre a densidade de estocagem e a atividade da GPx, efeito não observado para as demais enzimas. Esta resposta sugere que o aumento da densidade de estocagem induz a formação de espécies reativas de oxigênio, sendo esta resposta similar à encontrada por Oliveira et. al. (2008) expondo *Liza aurata* a contaminantes químicos. Esses autores concluíram que a GPx, associada com a GSH, formam o principal mecanismo ligado à primeira linha de defesa enzimática contra  $H_2O_2$ . Assim, a atividade da GPx em *S. brasiliensis* pode ser considerada como uma resposta adaptativa ao estresse causado pelo manuseio e/ou pela densidade elevada.

Outras respostas adaptativas à atividade metabólica dos tecidos contra danos oxidativos são as proteínas de choque térmico e a regulação da GRP75 (Bermejo-Nogales et al., 2008), que poderiam ser utilizadas como ferramentas para a compreensão dos mecanismos de proteção e defesa causado pelo estresse. O aumento da atividade das enzimas de defesas antioxidantes GPX e CAT também foi observado em eritrócitos de trutas arco-íris, quando expostas a vários agentes estressores (Ozmen et al., 2007).

O aumento da concentração de hemoglobina como resposta a um estímulo estressor pode ser decorrente da elevação do consumo de oxigênio, numa tentativa de suprir o aumento da demanda energética (Nikinmaa et al., 1983). Esta alteração é acompanhada de hiperglicemia (Tavares-Dias et al., 2001; Urbinati e Carneiro, 2001; Carneiro e Urbinati, 2001), decorrente do aumento da liberação de cortisol que induz o incremento da gliconeogênese hepática (Mommensen et al., 1999), estimulando a produção de glicose (Montero et al., 1999). Em *S. brasiliensis*, as concentrações de hemoglobina no grupo com manuseio e de glicose em ambos os grupos apresentaram relação negativa com o aumento da densidade. A redução na [Hb] nas densidades mais elevadas também foi observada em *Oncorhynchus clarki* (338-2.998 peixes  $m^{-3}$ ; Wagner et al., 1997). No entanto, em *Salmo salar* (35-125 kg  $m^{-3}$ ; Kjartansson et al., 1988) e *O. mykiss* (7,2-38,8 kg  $m^{-3}$ ; Martínez et

al., 1994; 10.800-43.926 peixes m<sup>-3</sup>, Wagner et al., 1996), a [Hb] aumentou com o aumento das densidades de estocagem. Foi observada redução na [Hb] e glicose quando submetidos ao estresse de captura e manuseio em *Sparus aurata* (Montero et al., 1999) e *C. macropomum* (Tavares-Dias, 2001), sendo que em *Dicentrarchus labrax* (15-45 kg m<sup>-3</sup>; Di Marco et al., 2008) e *Clarias gariepinus* (500-3000 peixes m<sup>-3</sup>; Nieuwegiessen et al., 2008) as concentrações de glicose não mudaram nas diferentes densidades.

O presente estudo confirma as conclusões de estudos anteriores, que sugerem que a resposta da hemoglobina e de glicose varia entre espécies e de diferentes agentes estressores. Em *S. brasiliensis*, no entanto, os níveis mais baixos de glicose em peixes estocados em altas densidades podem estar relacionados ao estresse crônico. Este efeito pode ser direto (relacionados ao consumo de glicose aumentado) ou indireto (resultante da menor ingestão de alimentos por dia). Nos tratamentos com manuseio, o aumento da concentração de glicose até o dia 60 e subsequente redução sugere uma adaptação após a resposta inicial ao tratamento, uma condição também observada em *D. labrax* (Di Marco et al., 2008). A presença de níveis mais elevados de [Hb] no grupo sem manuseio mostra que essa condição conduz ao aumento da produção de hemoglobina, em comparação com os tratamentos com manuseio, mas sem interferir no volume de eritrócitos circulantes. Em contraste, em *C. macropomum*, o estresse reduziu a concentração de hemoglobina e do número de hemácias, mas aumentou o volume corpuscular médio (Tavares Dias et al., 2001). A adrenalina, catecolamina produzida durante o estresse, causa inchaço nos eritrócitos *in vivo* (Nikinmaa, 1982; Nikinmaa e Huestis, 1984), aparentemente devido à retenção de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> no ambiente intracelular. Devido a este aumento na concentração intracelular de sal, a água entra nos eritrócitos e, conseqüentemente, aumenta seu volume (Railo et al., 1985).

As respostas ao estresse agudo e crônico são controladas por um complexo sistema neuro-endócrino, que libera catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) e cortisol (Urbinati e Carneiro, 2004), que estão relacionados com o controle da regulação iônica (McCormick, 2001). Estudos recentes indicam que o cortisol também está relacionado com o transporte de íons em peixes de água doce (Evans, 2002). As concentrações de Na<sup>+</sup> e o Cl<sup>-</sup> nas brânquias dos *S. brasiliensis* com manuseio apresentaram menor concentração do que nos peixes sem manuseio, condição que indica maior estresse nos peixes manejados. O estresse aumenta o fluxo de sangue nas brânquias

e aumenta a permeabilidade paracelular do epitélio, resultando em perdas iônicas em peixes de água doce (Postlethwaite e McDonald, 1995; Cech et al., 1996). Esta condição foi claramente registrada em *S. brasiliensis*, pois os alevinos perderam  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  para a água através de suas brânquias e absorveram  $\text{Ca}^{2+}$  no mesmo período, reduzindo este desequilíbrio. No entanto, as concentrações de íons no plasma não são bons indicadores de estresse crônico em alevinos de *S. brasiliensis*, pois os tratamentos estudados não induziram qualquer mudança significativa.

A elevada atividade inicial da GST e GR no dia 20 foi uma resposta à produção de espécies reativas de oxigênio. O equilíbrio entre a glutatona reduzida/oxidada foi mantido pela atividade elevada da GR. A diminuição da atividade da GPx após 60 dias também pode estar relacionado ao estresse oxidativo induzido pela densidade ou pelo estresse de manuseio. As espécies reativas de oxigênio são capazes de inativar as enzimas antioxidantes (Olszewer, 1995), mecanismo que precisa ser investigado. Essa condição foi confirmada pelo aumento progressivo dos níveis de íons na água, que atingiu o pico máximo aos 60 dias e pode estar relacionada a um fator que controla a atividade das enzimas antioxidantes. Os radicais hidroxila produzidos se ligam aos lipídios insaturados, presentes na membrana das células branquiais, causando perturbação nos mecanismos relacionados ao transporte de íons (bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , bomba de cálcio, sistema  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ). As alterações no equilíbrio osmótico podem ter contribuído para o menor crescimento do *S. brasiliensis* nos tratamentos com manuseio.

Portanto, os resultados deste estudo indicam que o manuseio periódico de *S. brasiliensis* aumenta a atividade de enzimas antioxidantes GR e GST para combater peróxidos, que são os radicais livres menos nocivos. Mais tarde, houve redução da GR e GST e a ativação simultânea de GPx ao longo do tempo, que neutraliza o peróxido de hidrogênio que é mais prejudicial. Assim, a atividade dessas enzimas é dependente do fator estressor manuseio e do tempo, condições que não foram registrados para a [Hb], Ht, lactato e de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  no plasma.

## 5. Conclusões

O manejo periódico no cultivo de *S. brasiliensis* afeta a atividade das enzimas relacionadas com defesas antioxidantes e influencia o efeito da densidade sobre o crescimento e sobre as respostas bioquímicas da espécie. A melhor densidade de estocagem

para o crescimento de *S. brasiliensis* foi de 30 peixes m<sup>-3</sup> (0,24 kg m<sup>-3</sup>). Os peixes criados sem manuseio apresentaram melhor crescimento do que os peixes com manuseio periódico, em todas as densidades testadas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a primeira autora e a Barra Grande Energética S.A. pelo apoio financeiro. B. Baldisserotto, A.L. Dafre and A.P.O. Nuñez são beneficiários do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com bolsas de pesquisa.

## Referências

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic anti oxidants in fresh water catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37–48.
- Aota, S., Holmgren, K.D., Gallagher P., Randall, D.J., 1990. A possible role for catecholamines in the ventilatory responses associated with internal acidosis or external hypoxia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 151, 57–70.
- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquac. Res.* 30, 887–892.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 42, 517–525.
- Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Saera-374 Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Sitja-Bobadilla, A. Perez-Sanchez, J., 2008. Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/

mortalin/mtHsp70/PBP74/HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 49B, 428–438.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brandão, F.R., Gomes, 380 L. de C., Chagas, E.C., 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amaz.* 36, 349–356.

Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.

Carneiro, P.C., Urbinati, E.C., 2001. Plasma electrolyte disturbance in matrinxã, *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. *J. Appl. Aquaculture* 11, 1–13.

Cech Jr., J.J., Bartholow, S.D., Young, P.S., Hopkins, T.E., 1996. Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. *Trans. Am. Fish. Soc.* 125, 308–320.

Chatterjee, N., Pal, A.K., Das, T., Mohammed, M.S., Sarma, K., Venkateshwarlu, G., Mukherjee, S.C., 2006. Secondary stress responses in Indian major carps *Labeo rohita* (Hamilton), *Catla catla* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry to increasing packing densities. *Aquac. Res.* 37, 472–476.

Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103–1123.

Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M.G., Massari, A., Mandich, A., Marino, G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275, 3193–28.

Evans, D.H., 2002. Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.* 293, 336–347.



Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 401 77, 218–231.

Kjartansson, H., Fivelstad, S., Thomassen, J.M., Smith, M.J., 1988. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. *Aquaculture* 73, 261–274.

Koroleff, F., 1983. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K., Ehrhart, M., Kremling, K. (Eds.), *Methods for seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 150–157.

Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88.

Martínez, F.J., Garcia-Riera, M.P. 409., Canteras, M., De Costa, J., Zamora, S., 1994. Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): simultaneous influence of various factors. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 95–100.

Mccormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish 1. *Amer. Zool.* 41,781–794.

Miller, L.L., Wang, F., Palace, V.P., Hontela, A., 2007. Effects of acute and subchronic exposures to waterborne selenite on the physiological stress response and oxidative stress indicators in juvenile rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 83, 263–271.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268.

Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53–60.

Moraes, F.R., Martins, M.L., 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds.),

Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Tecart, São Paulo, pp. 343–386.

Nikinmaa, M., 1982. Effects of adrenaline on red cell volume and concentration gradient of protons across the red cell membrane in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Molec. Physiol.* 2, 287–297.

Nikinmaa, M., Huestis, W.H., 1984. Adrenergic swelling in nucleated erythrocytes: cellular mechanisms in a bird, domestic goose and two teleosts, striped bass and rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 113, 215–224.

Nikinmaa, M., Soivio, A., Nakari, T., Lindgren, S., 1983. Handling stress in brown trout (*Salmo trutta*): Physiological responses to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackish water. *Aquaculture* 34, 93–99.

Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Sci. Total Environ.* 396, 70–78.

Olszewer, E., 1995. *Radicais livres em medicina*. 2 ed. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 204 p.

Ozmen, I., Atamanalp, M., Bayir, A., Sirkecioglu, A.N., Cengiz, M., Cengiz, M., 2007. The effects of different stressors on antioxidant enzyme activities in the erythrocyte of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). *Fresenius Environ. Bull.* 16, 922–927.

Papoutsoglou, S.E., Tziha, G., Vrettos, X., Athanasiou, A., 1998. Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquac. Eng.* 18, 135–144.

Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Pizzonia, G., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2006. Effects of rearing density on growth, brain neurotransmitters and liver fatty acid composition of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. *Aquac. Res.* 37, 87–95.

Postlethwaite, E.K., McDonald, D.G., 1995. Mechanisms of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> 450 regulation in freshwater adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. *J. Exp. Biol.* 198, 295–304.

Railo, E., Nikinmaa, M., Soivio, A., 1985. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 26, 725–732.

Rocha, R.M., Carvalho, E.G., Urbinati, E.C., 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã, *Brycon cephalus*, (Gunther, 1869), Teleostei: Characidae. Aquac. Res. 35, 1–5.

Rudneva, I.I., 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranchs and teleosts. Comp. Biochem. Physiol. 118C, 255–260.

Sevgiler, Y., Oruç, E.O., Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. Pest. Biochem. Physiol. 78, 1–8.

Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 1715–1733.

Sundin, L., 1999. Hypoxia and blood flow control in fish gills. In: Val, A.L.; Almeida-Val V.M.F. (Eds.), Biology of Tropical Fishes. INPA, Manaus, pp. 353–362.

Tavares-Dias, M., Sandrim, E.F. S., Moraes, F.R., Carneiro, P.C.F., 2001. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. B. Inst. Pesca 27, 43–48.

Urbinati, E.C., Carneiro, P.C.F., 2001. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleost: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. J. Aqua. Trop. 16, 75–85.

Urbinati, E.C., Carneiro, P.C.F., 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds.), Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Tecart, São Paulo, pp. 171–194.

Van de Nieuwegiessen, P. Boerlage, A., Verreth, J., Schrama, J., 2008. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. App. Anim. Behav. Sci. 115, 233–243.

Van Kampen, E.J., Zijlsta, W.G., 1964. Erythrocytometric methods and their standardization. In: Boroviczény, Ch.G. (Eds.), *Bibliotheca haematologica*. N°18, Lisbonne, Portugal, Fasc. 18. 124 p.

Wagner, E.J., Jeppsen, T., Arndt, R., Routledge, E.M.D., Bradwisch, Q., 1997. Effects of rearing density upon cutthroat trout hematology, hatchery performance, fin erosion, and general health and condition. *Prog. Fish-Cult.* 59, 173–187.

Wagner, E.J., Intelmann, S.S., Routledge, M.D., 1996. The effects of fry rearing density on hatchery performance, fin condition, and agonistic behavior of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry. *J. World Aquac. Soc.* 27, 264–274.

Wang, N., Hayward, R.S., Noltie, D.B., 2000. Effects of social interaction on growth of juvenile hybrid sunfish held at two densities. *N. Am. J. Aquac.* 62, 161–167.

Weingartner, M., Fracalossi, D.M., Beux, L.F., Moraes, F.R., Nuñez, A.P.O., Zaniboni-Filho, E., 2008. Desenvolvimento de tecnologia de cultivo para peixes nativos do Alto rio Uruguai. In: Zaniboni-Filho, E.; Nuñez, A.P.O. (Org.), *Reservatório de Itá: estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna*. EDUFSC, Florianópolis, pp. 257–306.

Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–333.

Zall, D.M., Fisher, M.D., Garner, Q.M., 1956. Photometric determination of chlorides in water. *Anal. Chem.* 28, 1665–1678.

Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 662 pp.

## Capítulo II

Artigo submetido a revista Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology

### Respostas de estresse agudo na criação de alevinos de *Salminus brasiliensis*

Neiva Braun<sup>1,4</sup>, Alcir Luiz Dafré<sup>2</sup>, Ronaldo Lima de Lima<sup>1,4</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>3</sup>, Alex Pires de Oliveira Nuñez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura/ Universidade Federal de Santa Catarina; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas/Universidade Federal de Santa Catarina; <sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia/Universidade Federal de Santa Maria; <sup>4</sup>Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aqüicultura/Universidade Federal de Santa Catarina

#### Resumo

Este estudo mensurou o estresse agudo em *Salminus brasiliensis* através da análise do hematócrito (Ht), da concentração da hemoglobina ([Hb]), da glicose, do lactato e os íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e Ca<sup>2+</sup> do plasma e das brânquias. As densidades de estocagem 30, 150 e 300 peixes m<sup>-3</sup> influenciaram o Ht, o lactato plasmático, a glicose plasmática e os íons K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nas brânquias, sendo que essas variáveis também apresentaram dependência do tempo. Nos tratamentos com manuseio o agente estressor manuseio foi aplicado aos 20, 40, 60 e 80 dias e nos tratamentos sem manuseio ele foi aplicado apenas aos 80 dias. Na quantificação do estresse agudo o material biológico coletado foi agrupado em intervalos de amostragem, nos tempos 0-10, 11-20 e 21-30 min, de maneira que foi mensurada a variação destes parâmetros nos 30 minutos iniciais, após a aplicação do agente estressor. A presença do manuseio periódico na criação de *S. brasiliensis* interferiu no Ht e na concentração da glicose plasmática, que foram consideradas tempo-dependentes. O rápido aumento das concentrações destes parâmetros é uma resposta fisiológica de *S. brasiliensis* para atender à demanda crescente de energia causada pelo agente estressor manuseio. O manuseio não propiciou alterações nos íons plasmáticos e branquiais, que são características de estresse agudo.

Palavras-chave: dourado, hematologia, íons, glicose, lactato

## 1. Introdução

A reação dos organismos aos diferentes agentes estressores é chamada de resposta ao estresse. Ele inclui um conjunto complexo de processos fisiológicos que são geralmente classificados em resposta primária, secundária ou terciária e coordenado pelo eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) (Barton & Iwama, 1991; Iwama et al., 2005). Estas respostas apresentam um limite de tolerância, que depende da espécie considerada, do tipo e da intensidade do agente estressor e do tempo que o organismo permanece sob o seu efeito (Wedemeyer, 1996).

As respostas primárias estão relacionadas a ativação do sistema neuroendócrino e dos hormônios corticosteróides, que alteram as concentrações das catecolaminas e dos corticosteróides no sangue. Estas variações hormonais causam modificações fisiológicas, gerando alterações na atividade metabólica, no balanço hidromineral, cardiovascular, respiratório e nas funções imunológicas, denominadas respostas secundárias. A resposta terciária está relacionada com mudanças no organismo do peixe, caracterizadas pela inibição do crescimento, alterações no ciclo reprodutivo e na resposta imune (Barton & Iwama, 1991; Barton, 2002; Iwama et al., 2005).

O estresse pode ser agudo ou crônico, sendo que os principais agentes causadores do estresse agudo são o manejo, as mudanças do ambiente, como as rápidas alterações da temperatura da água, o confronto com predadores, o transporte, a rede de captura e o confinamento (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Kubílay & Uluköy, 2002). Os principais agentes causadores do estresse crônico são a superpopulação, os distúrbios freqüentes e repetidos e a deterioração da qualidade de água (Wendelaar Bonga, 1997; Santos et al., 2010). No entanto, estresse agudo e crônico se sobrepõem uns aos outros durante o ciclo de vida dos peixes. As conseqüências dessa sobreposição incluem uma modulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal pelo estresse crônico, que pode interferir na resposta ao estresse agudo (Barcellos et al., 1999; 2006). A perseguição, a captura e exposição ao ar (Kubílay & Uluköy, 2002; Brydges et al. 2009; Hoshiba et al., 2009), juntamente com densidade elevada, o que é fundamental para manter a produtividade (Papoutsoglou et al., 1998, Santos et al., 2010) são agentes estressores importantes na piscicultura intensiva.

Os níveis de estresse dos peixes podem ser mensurados através da análise de respostas fisiológicas e metabólicas (Mazur & Iwama,

1993; Rotllant & Tort, 1997; Kubilay & Uluköy, 2002; Ruane et al., 2002, Rocha et al., 2004; Barcellos et al. 2006). As análises de estresse secundário (glicose, ácido láctico, íons, cortisol, hematologia) utilizam métodos analíticos simples e de baixo custo (Wedwmeyer, 1996), sendo que as alterações nos níveis de glicose no sangue podem ser utilizadas para mensurar indiretamente as alterações na secreção de cortisol (Kubilay & Uloköy, 2002). Os resultados destas análises fornecem informações sobre as condições de sanidade dos peixes. Estas informações podem ser utilizadas como indicadores de bem-estar dos peixes e permitem o desenvolvimento de protocolos de manejo mais adequados para reduzir o estresse causado pelas práticas rotineiras na aquicultura e contribuir para o aumento da produção (Ruane et al., 2002; Conte, 2004) .

Poucas são as informações referentes às respostas ao estresse de espécies tropicais de interesse para a aqüicultura (Rocha et al., 2004). O dourado, *S. brasiliensis* (Cuvier, 1816) apresenta potencial para ser criado comercialmente, uma vez que cresce rapidamente e apresenta boa qualidade de carne (Mai & Zaniboni-Filho, 2005; Borghesis et al., 2008). Por apresentar este potencial, estudos sobre o crescimento e respostas bioquímicas (Braun et al., 2010) vêm sendo desenvolvidos, porém nenhuma informação a respeito da resposta ao estresse agudo está disponível.

Os efeitos do manuseio e da densidade são reconhecidos como prioritários na investigação em aqüicultura, pois a captura causa danos fisiológicos e endocrinológicos ao peixe (Brydges et al., 2008) e a densidade de estocagem tem influência direta sobre o seu bem-estar (Di Marco et al., 2008). As respostas de estresse agudo causadas pelo manuseio em *S. brasiliensis* foram avaliadas neste estudo.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Desenho experimental**

Os alevinos de dourado *S. brasiliensis* utilizadas no experimento foram produzidas pela reprodução induzida de reprodutores selvagens coletados no rio Uruguai, Brasil. Os agentes de estresse densidade (30, 150 e 300 peixes m<sup>-3</sup>) e manuseio (presente, ausente) foram usados em um modelo fatorial 3x2, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. O manuseio consistiu de perseguição, captura e exposição ao ar durante 30 s no dia experimental 20, 40, 60 e 80.

Antes do início do experimento, os peixes foram aclimatados às unidades experimentais por um período de uma semana. Nos tratamentos com manuseio, os peixes nas densidades 30, 150 e 300 peixes  $m^{-3}$  apresentaram uma média de 0,24, 1,17 e 1,70  $kg\ m^{-3}$ , respectivamente, e nos tratamento com ausência de manuseio as médias foram 0,18, 0,94 e 2,28  $kg\ m^{-3}$ , respectivamente. Em cada unidade experimental a média  $\pm$  (SD) do peso inicial e do comprimento padrão foram  $7,61 \pm 3,49\ g$  e  $8,68 \pm 0,17\ cm$  para a densidade de 30 peixes  $m^{-3}$ ,  $7,47 \pm 2,98\ g$  e  $8,73 \pm 0,15\ cm$  para 150 peixes  $m^{-3}$  e  $7,58 \pm 3,79\ g$  e  $8,64 \pm 0,96\ cm$  para 300 peixes  $m^{-3}$ .

O experimento foi conduzido pelo período de 80 dias em tanques com capacidade de 1000 L, conectados a um sistema de recirculação de água com temperatura constante ( $25,6 \pm 1,7\ ^\circ C$ ), aeração contínua e filtragem mecânica e biológica, com exposição a fotoperíodo controlado no regime 12:12 horas de luz e escuro.

Os peixes foram alimentados com ração extrusada contendo 42% de proteína bruta, oferecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Semanalmente foram monitoradas as concentrações de oxigênio dissolvido, de amônia total (Koroleff, 1983) e de amônia não-ionizada, a temperatura e o pH da água (multiparâmetro HACH), que apresentaram, respectivamente, os seguintes valores médios ( $\pm$ desvio padrão) ao longo do estudo:  $6,84 (\pm 0,75)\ mg\ L^{-1}$ ,  $0,14 (\pm 0,1)\ mg\ L^{-1}$  e  $0,0006 (\pm 0,00)\ mg\ L^{-1}$ ;  $25,6 (\pm 1,8)\ ^\circ C$  e  $6,9 (\pm 0,2)$ .

## 2.2. Variáveis analisadas

Este estudo analisou diversas variáveis hematológicas, enzimática e iônica. As coletas de material biológico nos tratamentos com manuseio foram periódicas, a cada 20 dias até os 80 dias. Após esta prática, o volume de água nos tanques foi reduzido, mantendo as densidades de estocagem dentro dos níveis avaliados. Nos tratamentos sem manuseio a coleta foi realizada apenas aos 80 dias.

Na coleta de material biológico foram retirados três peixes de cada unidade experimental. A fim de caracterizar o estresse agudo, os parâmetros foram analisados em material biológico amostrado em intervalos de 0-10, 11-20 e 21-30 min. O tempo foi cronometrado a partir do tempo decorrido após a retirada do primeiro peixe dos tanques, avalido a variação dos parâmetros ao longo do tempo. O estresse agudo foi analisado apenas para variáveis que não apresentaram diferenças significativas entre as densidades (Tabela 2), uma vez que o número mínimo de peixes necessários para a análise estatística foi obtida apenas



quando os peixes foram distribuídos em intervalos de tempo, independentemente da densidade.

Tabela 2. Parâmetros sanguíneos, plasmáticos e brânquias de *Salminus brasiliensis* que apresentam diferenças significativas (\*) ou não significativas (ns) entre as densidades de 30, 150 e 300 peixes m<sup>-3</sup>, em diferentes dias de amostragem, utilizando o teste de Tukey ou de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ). SM = sem manuseio. na = não analisado. Dados de glicose no dia 20 e dos íons Cl<sup>-</sup> e Na<sup>+</sup> no dia 60 não foram analisados devido a problemas técnicos

Variável	20	40	60	80	80 SM
Ht	*	ns	ns	ns	ns
Hb	ns	ns	ns	ns	ns
Glicose	na	ns	ns	*	ns
Lactato	*	ns	ns	*	ns
Na <sup>+</sup> plasmático	na	ns	ns	ns	ns
Cl <sup>-</sup> plasmático	na	ns	ns	ns	ns
K <sup>+</sup> plasmático	na	ns	ns	ns	ns
Ca <sup>2+</sup> plasmático	na	ns	ns	ns	ns
Na <sup>+</sup> branquial	ns	ns	na	ns	ns
Cl <sup>-</sup> branquial	*	ns	na	ns	ns
K <sup>+</sup> branquial	ns	ns	ns	ns	*
Ca <sup>2+</sup> branquial	ns	ns	ns	ns	ns

O sangue foi obtido a partir do punção da veia caudal, com seringa heparinizada (Heparin-Cristália, SP/Brasil), e mantido em gelo até o uso. Após centrifugação (3000 xg/5 min), o plasma foi obtido a partir de uma alíquota de sangue que foi armazenado a 4°C para análise de glicose e lactato e, posteriormente, armazenado em nitrogênio líquido. O sangue também foi centrifugado por 5 min em tubos capilares em uma microcentrífuga (Evlab, PR/Brasil) para obtenção do hematócrito (Ht). A concentração de hemoglobina ([Hb]) foi determinada pelo método de cianometemoglobina (Van Kampen & Zijlstra, 1964). Os tecidos branquial e sanguíneo foram utilizados para a análise das concentrações de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e Ca<sup>2+</sup>.

As concentrações de glicose e lactato foram determinadas com kits Biotécnica (Varginha, MG / Brasil) e Kovalente (São Gonçalo, RJ / Brasil), respectivamente, seguindo as instruções dos fabricantes. A concentração de íons  $\text{Cl}^-$  no plasma e nas brânquias foi determinada de acordo com Zall et al. (1956) e as concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  em fotômetro de chama (Micronal B260, SP/Brasil). Os procedimentos foram similares para a análise no plasma e nas brânquias, exceto que ao tecido branquial foi adicionado ácido nítrico 2N na proporção de 3,0 ml por g de tecido. Este tecido foi incubado a 70°C por 48 h em estufa, e o sobrenadante foi retirado para as análises. As concentrações de glicose no dia 20 e de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  no dia 60 não estão disponíveis devido a problemas técnicos.

### 2.3. Análise estatística

As variáveis estudadas foram comparadas entre as densidades através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, quando os requisitos de normalidade/homocedasticidade foram atendidos ou o teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn, em caso contrário. O nível de significância de 5,0% foi utilizado em todas as análises.

## 3. Resultados

O tempo de amostragem só influenciou as concentrações de hematócrito, glicose e lactato. As respostas de estresse agudo foram diferentes entre os intervalos de tempo para os peixes na presença e na ausência de manuseio. O manuseio inteferiu no Ht, no dia 80 (Figura 5A) e nas concentrações de glicose no dia 60 (Figura 5B).

Nos tratamentos sem manuseio foi verificado diferenças nas concentrações de glicose (Figura 6A) e lactato (Figura 6B). Nessas variáveis ocorreu aumento na concentração ao longo do tempo.

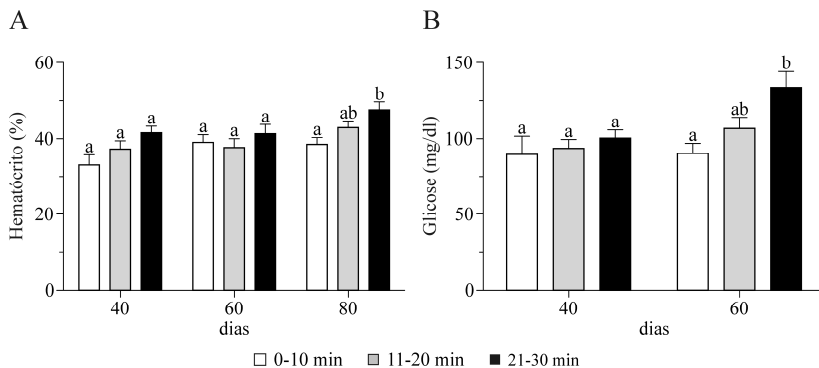


Figura 5. (A) hematócrito e (B) concentração da glicose plasmática entre os intervalos de coleta 0 – 10 min, 11 – 20 min e 21 – 30 min em *Salminus brasiliensis* com manuseio. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os intervalos de amostragem nos dias 40, 60 e 80. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média.

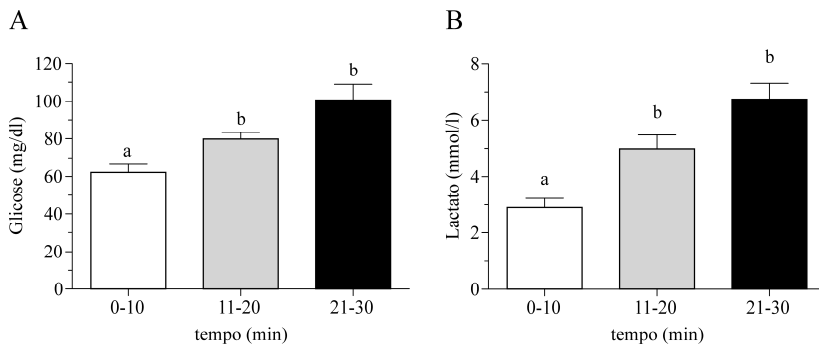


Figura 6. Concentração da (A) glicose plasmática e (B) lactato plasmático entre os intervalos de coleta 0 – 10 min, 11 – 20 min e 21 – 30 min em *Salminus brasiliensis* sem manuseio aos 80 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os intervalos de amostragem. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média.

#### 4. Discussão

Os resultados deste estudo indicaram que o manuseio é um agente estressor em *S. brasiliensis*, resposta similar aquela observada em *Sparus aurata* e *Colossoma macropomum*, que apresentaram alteração na [Hb] e na glicose quando submetidos à captura e manuseio (Montero et al., 1999; Tavares-Dias et al, 2001). As densidades de estocagem não alteraram as respostas fisiológicas de *S. brasiliensis*, uma vez que na ausência do manuseio a densidade não influenciou as respostas secundárias ao estresse. Em *Oncorhynchus mykiss* a densidade também não alterou o Ht, a glicose e os íons plasmáticos (Ellis et al., 2002).

O acúmulo de procedimentos estressores que ocorrem durante uma captura (perseguição, hipóxia, injúrias causadas pela rede) pode causar elevação nos parâmetros relacionados às respostas de estresse nos peixes (Hoshiya et al., 2009). O estresse prolongado (crônico) pode induzir o tecido interrenal a um processo adaptativo, interferindo na resposta de estresse agudo. Esta condição é evidenciada no presente estudo pela concentração da glicose e pelo Ht dos peixes do tratamento com manuseio periódico, que apresentaram resposta de estresse agudo apenas aos 60 e 80 dias. O aumento do número de células vermelhas contribui para aumentar a distribuição de oxigênio, sendo que a hiperglicemia ajuda a suprir a demanda energética (Wedemeyer, 1996) através da ativação da glicogenólise/gliconeogênese e da inibição da glicólise, que é controlada por um complexo sistema neuro-endócrino, que inclui a adrenalina e o cortisol (Hazon & Balment, 1997). No presente estudo, o estresse causado pelo manuseio ao longo do tempo foi cumulativo, o que afetou a resposta ao estresse agudo. Isto pode ser verificado nas concentrações de glicose no intervalo 21-30 min, uma vez que as concentrações de glicose em peixes com manuseio aos 60 dias foram superiores aos não manuseados no dia 80.

Os ajustes temporais nos parâmetros relacionados ao suprimento energético, observados neste estudo, sugerem que o estresse crônico de manuseio periódico é capaz de exercer uma influência na resposta ao estresse agudo em *S. brasiliensis*.

A interferência do manuseio na resposta ao estresse agudo de *S. brasiliensis* foi caracterizada pela utilização do metabolismo anaeróbio como fonte de energia nos tratamentos sem manuseio. Isto pode ser evidenciado pelo aumento nas concentrações plasmáticas de lactato, que está relacionada com a glicólise anaeróbia. Esta via metabólica também pode ser ativada em condições de hipóxia, onde o glicogênio armazenado no fígado e nos músculos pode ser usado para produzir

ATP, liberando lactato como um subproduto (Lehninger et al., 1995). O aumento das concentrações de lactato é uma condição típica de peixes estressados, especialmente se o agente estressor leva a uma redução na disponibilidade de O<sub>2</sub> ou conduz a um aumento da atividade física (Wedemeyer, 1996, Thomas et al., 1999). Apesar de *S. brasiliensis* ser considerada uma espécie não liberadora de lactato (Moraes et al., 2004), em nosso estudo esta espécie apresentou respostas características de metabolismo anaeróbica. Esta resposta está condicionada a combinação do fator estressor captura, que induz o aumento da atividade natatória, associada a exposição ao ar por 30 s, que causa anóxia, o que desencadeia a resposta anaeróbica. O aumento nos níveis de lactato após a captura também foi observado em *Dentex dentex* (Morales et al., 2005).

A glicose apresentou respostas de estresse agudo em condição de ausência ou presença de manuseio, confirmando que este parâmetro é um bom indicador de resposta secundária de estresse, conforme verificado em outros estudos (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Morales et al., 2005). A ausência de respostas de estresse agudo no Ht no tratamento sem manuseio indica que este parâmetro é influenciado pelo estresse crônico, como registrado em *Dentex dentex* (Morales et al., 2005).

O aumento da adrenalina altera o fluxo de íons, que conduz ao aumento da pressão sanguínea e à vasodilatação das brânquias, aumentando assim o fluxo sanguíneo para as lamelas branquiais (Sundin, 1999) e causando a perda de íons sódio e cloreto do sangue para o meio externo (Hoshiba, 2009). Estas alterações iônicas, características de condição de estresse, não foram encontradas em *S. brasiliensis*. A ausência de alterações iônicas plasmáticas e branquiais e da [Hb] para essa espécie indica que o manuseio não estimula a resposta de estresse agudo nestes indicadores. A magnitude das respostas do estresse é influenciada por vários fatores, como a espécie de peixe, o tipo de estímulo e o tempo de exposição ao fator estressor (Tavares-Dias et al., 2001, Barton, 2002). A rápida elevação de alguns parâmetros de resposta secundária ao estresse após a captura foi avaliado em outras espécies. As respostas ao estresse de *Pseudoplatystoma corruscans* até 30 min após a captura foram semelhantes aos apresentados em nosso estudo, incluindo um aumento da glicose, a ausência de alterações nos níveis de hemoglobina e no nível iônico. No entanto, Ht diminuiu com o tempo de coleta das amostras (Fagundes & Urbinati, 2008), uma resposta oposta àquela observada em *S. brasiliensis*. Para *Brycon amazonicus* não foi registrada variação no K<sup>+</sup> e na [Hb] até 60 min após

a captura, condição similar a encontrada neste estudo, porém apresentou alterações nos níveis de cloreto plasmático e de  $\text{Na}^+$ , sem alterações na glicose e no Ht (Hoshiba et al., 2009), diferindo do resultado registrado em *S. brasiliensis*.

## 5. Conclusões

No tratamento com manuseio periódico foram observadas respostas de estresse agudo na glicose e no Ht, que são dependentes do tempo de coleta da amostra, o que demonstra a sensibilidade da espécie ao manuseio. No entanto, o manuseio não estimulou a resposta característica de estresse agudo nos íons plasmáticos e branquiais. Na ausência de manuseio, as respostas características de estresse agudo foram observadas na glicose e no lactato. Com base nos dados, é possível concluir a presença/ausência do manuseio no cultivo de *S. brasiliensis* influenciar algumas respostas secundárias de estresse agudo nessa espécie.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida à primeira autora e à Barra Grande Energética S.A. pelo apoio financeiro. B. Baldisserotto, A.L. Dafré e A.P.O. Nuñez são beneficiários do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com bolsas de pesquisa.

## Referências

- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999. The effects of stoking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquac. Res.* 30, 887–892.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* 253, 317–321.

- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 42, 517–525.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.
- Borghesis, R., Dairiki, J.K., Cyrino, J.E.P., 2008. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. *Aquacult. Nutr.* 15, 453–458.
- Braun, N., Lima, R.L. de, Baldisserotto, B., Dafre, A.L., Nuñez, A.P.O., 2010. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. *Aquaculture* 301, 22–30.
- Brydges, N.M., Boulcott, P., Ellis, T., Braithwaite, V.A., 2009. Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *App. Anim. Behav. Sci.* 116, 295–301.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *App. Anim. Behav. Sci.* 86, 205–223.
- Di Marco, P.; Priori, A.; Finoia, M.G.; Massari, A.; Mandich, A.; Marino, G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275, 319–328.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* 61, 493–531.
- Fagundes, M., Urbinati, E.C., Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. 2008. *Aquaculture* 276, 112–119.
- Hazon, N., Balment, R.J., 1997. Endocrinology. In: Evans, D.H. (Eds.), *The physiology of fish*. CRC, New York, pp. 441–461.

Hoshiba, M.A., Gonçalves, F.D., Urbinati, E.C., 2009. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. *Acta Amaz.* 39, 445–452.

Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2005. Stress in fishes. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), *The physiology of fish*. Taylor & Francis, London, pp. 319–342.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Ed. Sarvier, 1995.

Koroleff, F., 1983. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K., Ehrhart, M., Kremling, K. (Eds.), *Methods for seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 150–157.

Kubılay, A., Uluköy, G., 2002. The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J. Zool.* 26, 249–254.

Mai, M.G., Zaniboni-Filho, E., 2005. The effect of storage age in external tanks in the larviculture performance of *Salminus brasiliensis* (Osteichthyes, Characidae). *Acta Sci.* 27, 287–296.

Mazur, C.F., Iwama, G.K., 1993. Effect of handling and stocking density on hematocrit, plasma cortisol, and survival in wild and hatchery-reared chinook salmon (*Onchorynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 112, 291–299.

Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53–60.

Moraes, G., Choudhuri, J.V., Souza, R H.S., Neto, C.S., 2004. Metabolic effects of exercise in the golden fish *Salminus maxillosus* "dourado" (Valenciennes, 1849). *Braz. J. Bio.* 64, 655–660.

Morales, A.E., Cardenete, G., Abellán, E., García-Rejón, L., 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquac. Res.* 36, 33–40.

Papoutsoglou, S.E.; Tziha, G.; Vrettos, X.; Athanasiou, A., 1998. Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea



bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquac. Eng.* 18, 135–144.

Rocha, R.M. da, Carvalho, E.G., Urbinati, E.C., 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquac. Res.* 35, 245–249.

Rotllant, J., Tort, L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J. Fish Biol.* 51, 21–28.

Ruane, N.M., Carballo, E.C., Komen, J., 2002. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquac. Res.* 33, 777–784.

Santos, G.A., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J.H.W.M., Verreth, J.A.J., 2010. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): the combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture* 299, 73–80.

Sundin, L., 1999. Hypoxia and blood flow control in fish gills. In: Val, A.L., Almeida-Val V.M.F. (Eds.), *Biology of Tropical Fishes*. INPA, Manaus, pp. 353–362.

Tavares-Dias, M., Sandrim, E.F.S., Moraes, F.R. de, Carneiro, P.C.F., 2001. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *B. Inst. Pesca.* 27, 43–48.

Thomas, P.M., Pankhurst, N.W., Bremner, H.A., 1999. The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *J. Fish Biol.* 54, 1177–1196.

Van Kampen, E.J., Zijlstra, W.G., 1964. Erythrocytometric methods and their standardization. In: Boroviczény, Ch.G. (Eds.), *Bibliotheca haematologica*. Nº18, Lisbonne, Portugal, Fasc. 18. 124 p.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.

Wedemeyer, G.A., 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall, ITP, New York, 232p.

Zall, D.M., Fisher, M.D., Garner, Q.M., 1956. Photometric determination of chlorides in water. *Anal. Chem.* 28, 1665–1678.

### Capítulo III

Artigo a ser submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

#### Crescimento e resposta de estresse de dourados criados em tanques-rede

Neiva Braun<sup>(1,4)</sup>, Alcir Luiz Dafre<sup>(2)</sup>, Ronaldo Lima de Lima<sup>(1,4)</sup>,  
Luis Fernando Beux<sup>(3)</sup>, Fernanda Franciele Brol<sup>(3)</sup> e  
Alex Pires de Oliveira Nuñez<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. <sup>(2)</sup>Laboratório de Defesas Celulares, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. <sup>(3)</sup>Aquática Consultoria e Assessoria, Concórdia/SC. <sup>(4)</sup>Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

**Resumo** - Este estudo avaliou os níveis de estresse e o crescimento de juvenis de *Salminus brasiliensis* criados em tanques-rede no reservatório da usina hidrelétrica de Itá nas densidades de estocagem 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup> que apresentavam, respectivamente, peso e comprimento iniciais de 49,7 ± 2,0 g e 16,0 ± 0,5 cm e 48,4 ± 2,1 g e 15,5 ± 0,4 cm. Os níveis de estresse foram mensurados pela análise do hematócrito, as concentrações de hemoglobina, da glicose plasmática e do lactato plasmático. Na quantificação do crescimento foi avaliado o peso total, o comprimento padrão, a biomassa total, a conversão alimentar aparente e o consumo alimentar diário aparente dos peixes. Os parâmetros fisiológicos e de crescimento foram comparados entre as densidades de estocagem e entre os tempos utilizados para a sua amostragem (0-10 min; 11-20 min e 21-30 min.). A glicose é um bom indicador de resposta ao estresse para esta espécie, sendo que o aumento da glicose e do lactato ao longo do tempo indica que o manuseio é um fator estressor, que causa aumento do consumo energético.

Termos para indexação: *Salminus brasiliensis*, glicose, lactato, hematócrito, hemoglobina, usina hidrelétrica de Itá

## Introdução

Os sistemas intensivos de produção de peixes compõem um conjunto de métodos que são divididos em diversas modalidades, sendo uma delas os tanques-rede (Ozório et al., 2004). Os tanques-rede utilizam menor espaço físico para o cultivo e são menos manejados, quando comparados com os viveiros de terra tradicionalmente utilizados. Apresentam também um baixo investimento inicial e viabilizam a utilização de reservatórios de água para a piscicultura e o cultivo de mais de uma espécie na mesma área (Carneiro et al., 1999; Sampaio & Braga, 2005). O aumento de densidade pode aumentar a lucratividade, desde que o máximo de produção seja atingido sem provocar redução substancial da qualidade ambiental e das taxas de crescimento (Silva et al., 2000).

A densidade de estocagem considerada ideal depende do tamanho dos exemplares, do sistema de cultivo utilizado e da espécie cultivada (Baldisserotto, 2002). Os peixes criados em baixas densidades de estocagem apresentam boa taxa de crescimento e alta porcentagem de sobrevivência, porém baixa produção por área. As baixas densidades também podem influenciar o aparecimento de classes hierárquicas de dominância e subordinação, nas quais os dominantes monopolizam as zonas de alimentação, levando ao crescimento diferenciado entre as classes (MacLean & Metcalfe, 2001). As altas densidades podem melhorar os índices de conversão alimentar, diminuir a heterogeneidade (Bozano et al. 1999) e reduzir o comportamento agressivo durante os manejos rotineiros, inclusive durante a captura (Rocha et al., 2004). Porém as altas densidades podem afetar a taxa de crescimento e podem causar estresse (Cavero et al., 2003; Braun et al., 2010), que pode se tornar crônico e diminuir a produtividade, podendo também provocar surtos epidêmicos fatais (Montero et al., 1999; Ozório et al., 2004).

A captura, comum nas inspeções de rotina, nas biometrias, na seleção e no transporte é outro fator estressor comum em sistemas intensivos de cultivo. É uma ocorrência ocasional e tem característica aguda, mas é uma condição adicional aos estímulos estressores de caráter crônico (Urbinati & Carneiro, 2004). A exposição a fatores estressores de forma aguda ou crônica produz respostas fisiológicas características de estresse (Hoshiba et al., 2009) e por isso a combinação do estresse agudo e do crônico nos sistemas de cultivo são objetos de estudo (Rotllant & Tort, 1997; Barcellos et al., 2006), pois ambos estão interligados. Os efeitos do estresse crônico sobre a resposta do estresse agudo são influenciados pela modulação do eixo hipotálamo-pituitária-

interrenal (HPI) durante o ciclo vital, entretanto o comprometimento do eixo HPI pode impedir o desenvolvimento de respostas na fase aguda (Barcellos et al., 1999; 2006).

Vários parâmetros e metodologias podem ser utilizados na mensuração do estresse, sendo que entre os métodos analíticos mais simples e de baixo custo estão a glicose, o ácido láctico e as análises hematológicas (Wedemeyer, 1996). O conhecimento das características hematológicas é uma ferramenta muito importante para a discussão das respostas ao estresse (Martins et al., 2004).

No entanto, poucas são as informações referentes às respostas ao estresse de espécies nativas da América do Sul (Rocha et al., 2004; Brandão et al., 2006) como o dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816).

Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar os níveis de estresse e o crescimento de juvenis de *S. brasiliensis* criados em tanques-rede, no reservatório da usina hidrelétrica de Itá em duas densidades de estocagem:

## **Material e métodos**

O experimento foi instalado no reservatório da usina hidrelétrica Itá, localizado entre os municípios de Itá (SC) e Aratiba (RS), no alto rio Uruguai. O estudo foi conduzido por 40 dias em seis tanques-rede de 1,0 m<sup>3</sup> revestidos de tela PVC-SANET no período de novembro e dezembro de 2007. Os juvenis de dourado (*S. brasiliensis*) utilizados no experimento foram obtidos de desovas induzidas de reprodutores selvagens coletados na natureza, na bacia do alto rio Uruguai.

Os agentes estressores testados foram a densidade de estocagem e o manuseio, que consistiu na perseguição, captura e exposição dos peixes ao ar por um período de 30 s aos 20 e 40 dias experimentais. As densidades de estocagem 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup> (0,81 e 1,63 kg m<sup>-3</sup>) foram avaliadas em um delineamento inteiramente ao acaso com três repetições. O peso médio, o comprimento padrão médio e a biomassa inicial estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Peso, comprimento padrão, biomassa total, conversão alimentar aparente, consumo alimentar diário aparente (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis de *Salminus brasiliensis* criados em tanques-rede nas densidades de 15 e 30 peixes  $m^{-3}$  por 40 dias. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre as densidades de estocagem.  $n$  = número de peixes amostrados.

Período	Variável	15 peixes $m^{-3}$	30 peixes $m^{-3}$
Inicial			
	Peso (g)	49,7 a $\pm 2,0; n = 9$	48,4 a $\pm 2,1; n = 9$
	Comprimento padrão (cm)	16,0 a $\pm 0,5; n = 9$	15,5 b $\pm 0,4; n = 9$
	Biomassa total (kg $m^{-3}$ )	0,75 a $\pm 0,01; n = 9$	1,45 b $\pm 0,02; n = 9$
40 dias			
	Peso (g)	61,8 a $\pm 7,7; n = 6$	62,2 a $\pm 8,9; n = 9$
	Comprimento padrão (cm)	16,9 a $\pm 0,7; n = 6$	16,5 a $\pm 12,3; n = 9$
	Biomassa total (kg $m^{-3}$ )	0,93 a $\pm 0,05; n = 9$	1,87 b $\pm 0,13; n = 9$
	Conversão alimentar aparente	9,38 a $\pm 4,2; n = 2$	5,58 a $\pm 1,48; n = 3$
	Consumo alimentar diário aparente	5,7 a $\pm 0,1; n = 2$	3,9 b $\pm 0,1 n = 3$

A aplicação do agente estressor manuseio, as biometrias e as coletas do material biológico foram realizadas aos 20 e aos 40 dias de experimento. As densidades iniciais foram mantidas pela substituição dos indivíduos coletados por outros peixes, com peso e comprimento similar, identificados com uma marca na nadadeira caudal, realizada logo após a coleta. Os peixes utilizados nessa reposição não foram utilizados nas coletas de material biológico.

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados com ração extrusada comercial contendo 42% de proteína bruta,

oferecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente. O consumo foi registrado, pesando-se a quantidade de ração antes da alimentação e diminuindo-se o peso da sobra no final da alimentação. A sobra de ração foi retirada manualmente e pesada após trinta minutos (Tabela 4).

Tabela 4. Ração oferecida, sobra e consumo de ração (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis *Salminus brasiliensis* cultivados em tanques-rede nas densidades de 15 e 30 peixes  $m^{-3}$  por 40 dias.

	15 peixes $m^{-3}$	30 peixes $m^{-3}$
Ração oferecida (g)	1.837,5 $\pm$ 3,5	2.450,0 $\pm$ 26,5
Sobra de ração (g)	129,5 $\pm$ 40,3	133,3 $\pm$ 28,1
Ração consumida (g)	1.708,0 $\pm$ 43,8	2.316,7 $\pm$ 54,2

Diariamente foram monitoradas a concentração de oxigênio dissolvido, a temperatura, o pH e a condutividade elétrica com um multiparâmetros HACH e a transparência da água com o disco de Secchi. Ao longo do estudo essas variáveis apresentaram, respectivamente, os seguintes valores médios ( $\pm$  desvio padrão): 7,95  $\pm$  2,43  $mg\ L^{-1}$ , 25,5  $\pm$  2,5  $^{\circ}C$ , 7,89  $\pm$  0,47, 43,7  $\pm$  3,13  $\mu S\ cm^{-1}$  e 1,18  $\pm$  0,21 m.

O crescimento foi avaliado através do peso (g) = peso total médio final – peso total médio inicial; do comprimento (cm) = comprimento padrão médio final – comprimento padrão médio inicial; da biomassa final (kg) = média final de peso dos peixes por tratamento (kg) \* número final de peixes; da conversão alimentar aparente = peso total da ração fornecida/(biomassa final - biomassa inicial) e do consumo alimentar diário aparente = peso total da ração fornecida no tanque-rede/número de peixes por no tanque-rede/número de dias do experimento.

O estresse foi avaliado pela análise do hematócrito, da concentração da hemoglobina, da glicose e do lactato. Para a análise destes parâmetros fisiológicos foram utilizados três peixes por tanque-rede, sendo coletados nove indivíduos por tratamento, aos 20 e 40 dias, totalizando 36 peixes. As coletas foram realizadas no barco, ao lado das unidades experimentais.

O sangue foi obtido a partir do puncionamento da veia caudal, com seringa heparinizada (Heparin-Cristália, SP/Brasil), sendo o mesmo

armazenado em microtubos de 1,5 ml que foram acondicionados em gelo picado. Uma alíquota do sangue foi utilizada nas análises de hematócrito e da concentração de hemoglobina, enquanto outra foi centrifugada (3000 x g/5 minutos) para a obtenção do plasma, que foi estocado na geladeira para as análises de glicose e lactato.

O sangue também foi centrifugado por 5 min em tubos capilares em uma microcentrífuga (Evlab, PR / Brasil) para obtenção do hematócrito. A concentração de concentração de hemoglobina foi determinada pelo método de cianometemoglobina (Van Kampen & Zijlsta, 1964). As concentrações de glicose e lactato foram determinadas com kits Biotécnica (Varginha, MG / Brasil) e Kovalente (São Gonçalo, RJ / Brasil), respectivamente, seguindo as instruções dos fabricantes.

Para avaliação do crescimento e dos parâmetros fisiológicos foi aplicado o teste t (Zar, 1996) ao nível de significância de 5,0%, na comparação entre as duas densidades de estocagem.

A fim de se caracterizar o estresse agudo, os parâmetros fisiológicos também foram analisados em intervalos de amostragem de 0-10, 11-20 e 21-30 min. O tempo foi cronometrado a partir do tempo decorrido após a retirada do primeiro peixe dos tanques. Os peixes foram distribuídos nos intervalos de amostragem independentemente da densidade de estocagem a qual pertenciam, uma vez que para os parâmetros analisados a densidade não apresentou influência. Nesse caso as classes foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ao nível de significância de 5,0% quando necessário.

## **Resultados e discussão**

A densidade de estocagem não influenciou o peso, o comprimento padrão e a conversão alimentar de *S. brasiliensis*, uma vez que o peso, o comprimento e a conversão alimentar aos 40 dias foram iguais em ambas as densidades (Tabela 3), porém influenciou a biomassa e o consumo alimentar diário aparente, sendo esse aumento proporcional ao aumento da densidade. Esse aumento da biomassa foi similar ao registrado para a tilápia vermelha da Flórida (25, 50, 75 e 100 peixes m<sup>-3</sup>; Carneiro et al., 1999), para *Astyanax bimaculatus* (31, 62, 93 e 124 peixes m<sup>-3</sup>; Vilela & Hayashi, 2001) e para a tilápia tailandesa da linhagem Chitralatada (150, 200 e 250 peixes m<sup>-3</sup>; Sampaio & Braga, 2005).

Os juvenis de *S. brasiliensis* apresentaram menor desempenho em tanques-rede quando comparado ao registrado em peixes cultivados em ambientes com condições controladas. Os índices de conversão



alimentar nos peixes cultivados em laboratório variaram entre 1,5 e 2,0 (Braun et al., 2010) e em tanques-rede entre 2,5 e 5,0 (Beux et al., 2008). Estes resultados foram dependentes dos intervalos de manejo associados a densidades de estocagem (Beux et al., 2008; Braun et al., 2010). No presente estudo a conversão alimentar obtida na densidade 30 peixes  $m^{-3}$  foi similar à registrada por Beux et al. (2008) em criação de *S. brasiliensis* nesta mesma densidade com intervalos de manejo a cada 60 dias.

A presença do manuseio em intervalos curtos contribuiu para o pequeno crescimento de *S. brasiliensis* no presente estudo uma vez que o manuseio envolve a captura, que é considerada como um dos agentes estressores de maior poder estressor na criação de peixes (Urbinati e Carneiro, 2004). Neste procedimento ocorre acúmulo de agentes estressores, principalmente a perseguição, o ambiente de hipóxia e as injúrias causadas pela rede de captura (Hoshiba et al., 2009). Braun et al. (2010) demonstraram que o manejo afetou o crescimento de *S. brasiliensis* e Beux et al. (2008) obtiveram melhor crescimento na criação desta espécie em tanques-rede com intervalos maiores de manuseio (180 dias), associados a densidades de estocagem mais baixas (10 e 20 peixes  $m^{-3}$ ).

O tempo induziu aumento nas concentrações de glicose e de lactato nas duas densidades avaliadas (Figuras 7 A-B). Estes resultados indicaram que as condições experimentais do presente estudo produziram estresse nos peixes, uma vez que a hiperglicemia ajuda a suprir a demanda energética (Wedemeyer, 1996), através da ativação da glicogenólise/gliconeogênese, da inibição da glicólise e do incremento da gliconeogênese hepática, resultando na produção de glicose (Montero et al., 1999). O aumento temporal do lactato plasmático confirma a presença de estresse, uma vez que em situação de hipóxia tecidual o glicogênio, armazenado no fígado e nos músculos, pode ser utilizado como combustível para produzir ATP através da glicólise anaeróbica, formando o lactato como produto final (Lehninger et al., 1995). As concentrações de lactato registradas no presente estudo variaram entre 25 e 45 mmol/l, valores muito mais elevados do que o máximo registrado por Braun et al. (2010) em laboratório (5,5 mmol/l). Esta diferença indica que nos animais criados em tanques-rede esta rota metabólica é mais utilizada do que nos peixes-cultivados em laboratório, resposta que pode estar associada às condições ambientais dos tanques-rede, que estão localizados em represas artificiais, com constante exposição a agentes estressores (Beux et al., 2008).

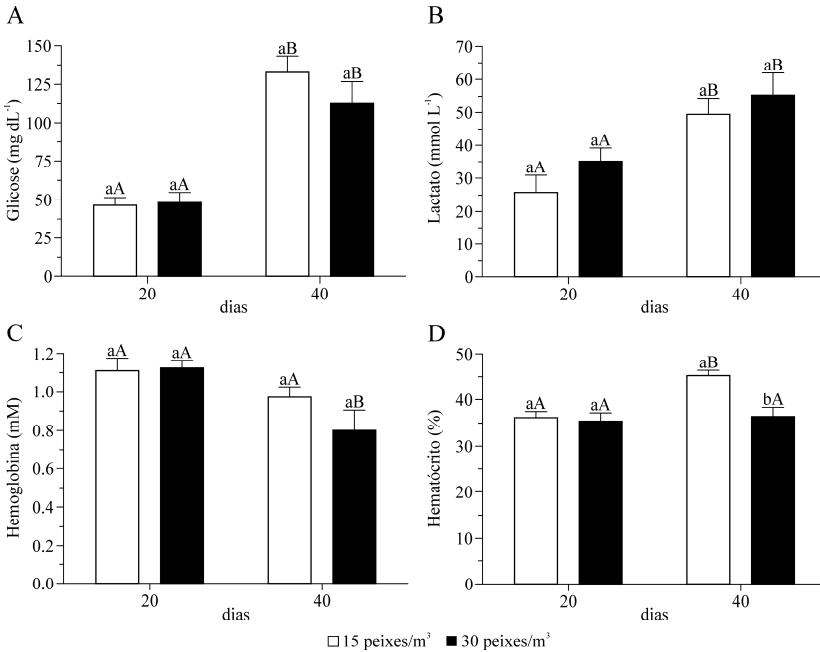


Figura 7. Concentrações da (A) glicose, (B) lactato plasmático, (C) hemoglobina e (D) hematócrito de juvenis de *Salminus brasiliensis* criados em tanques-rede no reservatório da UHE Itá nas densidades de 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup>, por 40 dias. Letras minúsculas diferentes representam a diferença (teste t; P < 0,05) entre as densidades em um mesmo dia. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença (teste t; P < 0,05) de uma mesma densidade de estocagem em dias diferentes. As linhas acima dos símbolos representam o desvio padrão da média.

O tempo induziu redução da hemoglobina na densidade 30 peixes m<sup>-3</sup> (Figura 7C). As concentrações de hemoglobina e do hematócrito estão interligadas e associadas às respostas ao estresse, sendo que a variação do hematócrito está relacionada com a alteração do volume de eritrócito. A adrenalina produzida durante o estresse causa inchaço nos eritrócitos *in vivo* (Nikinmaa e Huestis, 1984), aparentemente devido à retenção de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> no ambiente intracelular. Devido a este aumento na concentração intracelular de Na<sup>+</sup> e de Cl<sup>-</sup> a água entra nos eritrócitos e, conseqüentemente, aumenta seu volume (Railo et al., 1985). Como a função do eritrócito é transportar oxigênio e gás carbônico, papel

desempenhado pelo seu componente principal, a hemoglobina, vários peixes teleósteos apresentam correlação linear positiva entre o hematócrito e a concentração de hemoglobina (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Esta correlação não foi observada no presente estudo em nenhuma das densidades avaliadas, tendo sido registradas respostas antagônicas desses parâmetros. Aos 20 dias, quando o hematócrito estava mais baixo, as concentrações de hemoglobina estavam mais elevadas que aos 40 dias, quando o hematócrito aumentou (Figuras 7 C-D). Na densidade mais elevada, a redução temporal na concentração de hemoglobina pode estar condicionada ao estresse crônico. Na densidade mais baixa, entretanto, ocorreu aumento temporal do hematócrito sem alteração na concentração de hemoglobina indicando que o aumento no volume de eritrócitos circulantes não interferiu na concentração de hemoglobina.

O aumento do hematócrito sugere a ocorrência de elevação da demanda energética, indicando que os peixes apresentaram resposta de estresse. Para *Oreochromis niloticus* submetidas ao estresse de captura não foram registradas alterações (Martins et al., 2004). No entanto, em *C. macropomum* foi registrada redução no número de eritrócitos, no hematócrito e na concentração de hemoglobina (Tavares-Dias et al., 2001), sendo que o tambacu (híbrido de *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum*) não foi registrada alteração na concentração de hemoglobina (Martins et al., 2002).

O manuseio e a densidade de estocagem não estimularam a resposta aguda de estresse, uma vez que não foi observada diferença entre os intervalos de amostragem de 0-10, 11-20 e 21-30 min (Tabela 5), condição similar a registrada em *Brycon amazonicus* após exercício intensivo (Hoshiba et al., 2009).

## Conclusões

1. As densidades de estocagem 15 e 30 peixes  $m^{-3}$  (0,81 e 1,63  $kg\ m^{-3}$ ) não influenciaram o crescimento do *S. brasiliensis* criados em tanques rede.
2. A espécie apresentou aumento nos níveis de glicose e do lactato, característicos de peixes estressados, nas duas densidades de estocagem estudadas.
3. *S. brasiliensis* não apresentou respostas metabólicas características de estresse agudo.

Tabela 5. Respostas de estresse agudo da glicose, do lactato, da hemoglobina e do hematócrito de *Salminus brasiliensis* aos 20 e 40 dias, criados em tanques-rede no reservatório da UHE Itá nas densidades de 15 e 30 peixes m<sup>-3</sup>, através da análise dos parâmetros em intervalos de amostragem de 0-10, 11-20 e 21-30 min. Os parâmetros onde a densidade não exerceu influencia foram distribuídos independentemente da densidade de estocagem a qual pertenciam. Os parâmetros influenciados pela densidade foram distribuídos nas densidades as quais pertenciam.

Período	Parâmetro	Tempo de amostragem (minutos)		
		0 – 10	11 – 20	21– 30
20 dias				
	Glicose (mg dl <sup>-1</sup> )	35,1 ± 3,2; n= 6	37,0 ± 2,6; n= 5	36,3 ± 3,0; n= 6
	Lactato (mmol L <sup>-1</sup> )	27,2 ± 11,7; n= 5	36,7 ± 11,6; n= 5	26,4 ± 15,0; n= 4
	Hemoglobina (mM)	1,1 ± 0,1; n=6	1,1 ± 0,1; n=5	1,1 ± 0,07; n=6
	Hematócrito (%)	35,1 ± 3,2; n=6	37,0 ± 2,6; n=5	36,3 ± 3,0; n= 6
40 dias				
	Glicose (mg dl <sup>-1</sup> )	42,5 ± 8,9; n=5	41,0 ± 5,1; n=7	36,1 ± 4,8; n=4
	Lactato (mmol L <sup>-1</sup> )	44,0 ± 9,6; n=6	56,4 ± 18,4; n=7	62,4 ± 16,5; n=4
	Hematócrito (%)	0,9 ± 0,3; n=6	0,8 ± 0,3; n=7	0,8 ± 0,2; n=4
	Hemoglobina (mM)			
	15 peixes m <sup>-3</sup>	49,0 ± 0,7; n=2	44,0 ± 2,3; n=4	43,0 n=1
	30 peixes/m <sup>-3</sup>	38,1 ± 9,4; n= 3	37,1 ± 5,5; n=3	33,8 ± 2,0; n=3

Teste Kruskal-Wallis;  $P < 0,05$ ;  $n$  = número de peixes amostrados.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida à primeira autora, à Barra Grande Energética S.A. pelo apoio financeiro e a Amarildo Stringhini, pela ajuda na confecção dos tanques-rede.

## Referências

- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002. 212p.
- BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S.M.G.; LULHIER, F. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 887-892, 1999.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v. 253, p. 317-321, 2006.
- BEUX, F.L; FRACALOSI, D.M.; ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O., WEINGARTNER, M. Tecnologia de produção de peixes nativos em tanques-rede nos reservatórios de Machadinho e Itá, no rio Uruguai. In: CIRYNO, J.E.P. et al. (Org.). **Tópicos especiais em biologia aquática e aquíicultura II**. Jaboticabal, Sociedade Brasileira de Aquíicultura e Biologia Aquática, 2008. p. 53-67.
- BOZANO, G.L.N.; RODRIGUES, S.R.M.; CASEIRO, A.C.; CYRINO, J.E.P. Desempenho da tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* (L.) em gaiolas de pequeno volume. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 810-825, 1999.
- BRANDÃO, F.R.; GOMES, L. de C.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. Stress responses of pirarucu (*Arapaima gigas*) during routine aquaculture practices. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 349-356, 2006.
- BRAUN, N.; LIMA, R. L. de; BALDISSEROTTO, B.; DAFRE, A.L.; NUÑER, A.P.O. Growth, biochemical and physiological responses of

*Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. **Aquaculture**, v. 301, p. 22-30, 2010.

CARNEIRO, P.C.F.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N. Produção da tilápia vermelha da Flórida em tanques-rede. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 1-10, 1999.

CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D.R.; GANDRA, A.L. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 103-107, 2003.

HOSHIBA, M.A.; GONÇALVES, F.D.; URBINATI, E.C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 445-452, 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

MACLEAN, A.; METCALFE, N.B. Social status, access to food, and compensatory growth in the juvenile Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**. v. 58, p. 1331-1346, 2001.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR., J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho X *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, p. 195-204, 2002.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, p.71-80, 2004.

MONTERO, D.; IZQUIERDO, M.S.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGARA, J.M. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, p. 53-60, 1999.

NIKINMAA, M., HUESTIS, W.H. Adrenergic swelling in nucleated erythrocytes: cellular mechanisms in a bird, domestic goose and two teleosts, striped bass and rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 113, p. 215-224, 1984.

OZÓRIO, R.; AVNIMELECH, Y.; CASTAGNOLLI, N. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: CYRINO, José E.P. et al. (Org.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004, p.7-24.

RAILO, E., NIKINMAA, M., SOIVIO, A. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v. 26, 725-732, 1985.

ROCHA, R.M.; CARVALHO, E.G.; URBINATI, E.C. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 245-249, 2004.

ROTLLANT, J.; TORT, L. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. **Journal of Fish Biology**, v. 51, p. 21-28, 1997.

SAMPAIO, J.M.C.; BRAGA, L.G.T. Cultivo de tilápia em tanques-rede na barragem do Ribeirão de Saloméa – Floresta Azul – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 6, p. 42-52, 2005.

SILVA, P.C.; SOUZA, V.L.; PÁDUA, D.M.C.; DALACORTE, P.C. Efeito da densidade de estocagem no crescimento da tilápia vermelha tetrahíbrida (linhagem de Israel). In: FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE. 2000. Rio de Janeiro: Gráfica & Editora Ltda, 2000. p. 341-345.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of “tambaqui” *Collossoma macropomum* (CHARACIDAE) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, p. 43-48, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpres Complexo Gráfico, 2004. 144p.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, José E.P. et al. (Org.).

**Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo: TecArt, p.171-194, 2004.

VAN KAMPEN, E.J., ZIJLSTA, W.G. Erythrocytometric methods and their standardization. In: BOROVIČZÉNY, C. G. (Eds.). **Bibliotheca haematologica.** Lisbonne: n. 18, 1964.

VILELA, C.; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá**, v. 23, p. 491-496, 2001.

WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture systems.** New York: Chapman & Hall, 1996.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis.** New Jersey: Prentice Hall, 1996.



## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste estudo indicaram que os alevinos de *S. brasiliensis* apresentaram melhor crescimento na ausência do manuseio, quando comparados aos cultivados na presença de manuseio periódico, em todas as densidades testadas. A melhor densidade de estocagem para o crescimento nesta fase foi de 30 peixes m<sup>-3</sup> (0,24 kg m<sup>-3</sup>).

As defesas antioxidantes foram influenciadas negativamente pelo manuseio, mas foram pouco influenciadas pela densidade de estocagem. Foi registrado o aumento inicial e a posterior redução da atividade de enzimas antioxidantes GR e GST e a ativação simultânea da GPx ao longo do tempo. A atividade dessas enzimas foi dependente do fator estressor manuseio e do tempo, condições que não foram registrados para a [Hb], Ht, lactato e para os íons Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> no plasma.

Algumas respostas secundárias de estresse agudo dessa espécie foram influenciadas pela presença/ausência do manuseio. No tratamento com manuseio periódico a glicose e o Ht foram dependentes do tempo, indicando que a espécie é sensível a esta prática. O manuseio não estimulou a resposta característica de estresse agudo nos íons plasmáticos e branquiais. Na ausência de manuseio, as respostas características de estresse agudo foram observadas na glicose e no lactato.

No cultivo em tanques-rede os resultados mostram que nesta fase o *S. brasiliensis* pode ser cultivado nas densidades testadas. O aumento temporal da glicose e do lactato indicaram que há fatores estressores para essa espécie nessas condições, ao longo do experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ACKERMAN, P.A., et al. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, n. 4, p. 327-336, Nov. 2000.

ADRIANO, E.A., et al. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, n. 165, v. 1-2, p. 25-29, Oct. 2009.

AFFONSO, E.G., et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia.

**Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 3, Nov. 2002. p. 375-382. 2002.

AHMAD, I., et al. Induction of hepatic anti oxidants in fresh water cat fish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1523, n. 1, p. 37-48. Sep. 2000.

ALANÄRÄ, A.; BRÄNNÄS, E. Dominance in demand-feeding behavior in Arctic charr and rainbow trout: the effect of stocking density. **Journal of Fish Biology**, v.48, p. 242-254. 1996.

ALMEIDA, V.L.L. de; Hahn, Norma, S.; Vazzoler, A. E.A.M. Feeding patterns in five predatory fishes of thehigh Paraná River floodplain (PR, Brazil). **Ecology of Freshwater Fish**, Denmark, v. 6, p. 123-133. 1997.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002. 212 p.

BALDISSEROTTO, B. Medidas de fluxo iônico e sua aplicação para piscicultura. In: ANAIS. **AquaCiência**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006. CD-ROM.

BARBIERI, G., et al. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174. 2004.

BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. Growth and first sexual maturation size of *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae), in Mogi Guaçu river, state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 453-459. 2001.

BARBOSA, N.D.; ZANIBONI-FILHO, E. Curva de crescimento e idade de primeira maturação gonadal do dourado (*Salminus maxillosus*, VALENCIENNES, 1849) criado em cativeiro. In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA DA ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE AQUICULTURA, 8, 1990, Belo Horizonte. **Resumos ...** Belo Horizonte, 1990. p.18.

BARCELLOS, L.J.G., et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 15, p. 1465-1469. 2003.

BARCELLOS, L.J.G., et al. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 383-39, Apr. 2004.

BARCELLOS, L.J.G., et al. The effects of stoking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 887-892. 1999.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 317-321. Mar. 2006.

BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; LUCERO, L.F. Estudos preliminares sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p. 239-245. 1997.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525. 2002.

BARTON, B.A., et al. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid×shovelnose (*S. albus* × *platyrhynchus*) turgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement.

**Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 126, n. 1, p. 125-134, May. 2000.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, USA, v.1, p.3-26. 1991.

BERNAL SÁNCHEZ, G.L. **A influência do desenvolvimento da visão e do tamanho do alimento na larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae)**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BEUX, F.L. et al. Tecnologia de produção de peixes nativos em tanques-rede nos reservatórios de Machadinho e Itá, no rio Uruguai. In: Ciryno, J. E. P. et al. (org.). **Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura II**. Jaboticabal, Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2008. p. 53-67.

BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 5, p. 453-458. 2008.

BORGHETTI, J.R.; CANZI, C.; FERNANDEZ, D.R. The influence of different levels of protein on the growth of dourado (*Salminus maxillosum*). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, n. 3, p. 683-689, out. 1990.

BOZANO, G.L.N., et al. Desempenho da tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* (L.) em gaiolas de pequeno volume. **Scientia Agricola, Piracicaba**, v. 56, n. 4, Oct./Dec.1999.

BRANDÃO, F.R., et al. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 299-303. Mar. 2005.

BRANDÃO, F.R., et al. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, abr. 2004.

BRANDÃO, F.R., GOMES, L.CARVALHO, CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, n.3, p. 349-356. 2006.

CARNEIRO, P.C.F.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N. Produção da tilápia vermelha da Flórida em tanques-rede. **Scientia Agricola, Piracicaba**, v. 56, n. 3, July, 1999.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C.(a). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 4, p. 297-304. Apr. 2001.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C.(b). Plasma electrolyte disturbance in matrinxã, *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 11, n. 4, p. 1-13. Dec. 2001.

CAROLSFELD, J., et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Edinburg, v. 63, n. 2, p. 472-481. 2003.

CARVALHO, P.S.M. et al. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis*. **Marine Environmental Research**, n. 66, v.1, p. 205-207. July. 2008.

CATALDI, B.E., et al. The interrelationships between stress and osmoregulation in a euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 229-231. 2005.

CAVERO, B.A.S., et al. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 103-107. 2003.

CELADA, J.D., et al. Effects of stocking density on survival and growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) **Aquaculture International**, Netherlands, v.15, n.6, p. 461-465. Dec. 2007.

CHEN, GUAN-RU, et al. Characteristics of Blood in Common Carp, *Cyprinus carpio*, Exposed to Low Temperatures. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 5, n. 3, p. 21-31. Feb. 1995.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: Baldisserotto, B.; Gomes L. C. (org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 23-33.

CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3-4, p. 205-223. June. 2004.

DAIRIKI, J.K., et al. Densidade de estocagem para juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*. In: ANAIS. **AquaCiência**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006. CD-ROM.

ESPÍNOLA, L.A.; DOMINGUES, W.M.; BENEDITO, E. Variations in the content of energy in muscle of *Salminus brasiliensis* in different states of the gonadal development in the area of influence of the Manso reservoir Mato Grosso. **Iheringia. Serie Zoologia**, Porto Alegre, v. 98, n. 1, p. 143-147, Mar. 2008.

ESTEVES, K.E.; PINTO LOBO, A.V. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* (PISCES, CHARACIDAE) at cachoeira das Emas, Mogi-Guaçu river (São Paulo state, southeast Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 267-276, May. 2001.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 76, n. 1-4, p. 12-119. Apr. 2008.

FEITOSA, L.A., et al. Parâmetros populacionais e simulação do rendimento por recruta de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) do alto rio Paraná. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 317-323, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLOS, R., et al. Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, Amsterdam. v. 71, n. 1-2, p. 99-106. 1988.

FRACALOSSO, D.M., et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

FRAGA, C.G., et al. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: Val, L.A.; Almeida-Val, V.M.; Randall, D. J. (eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus, INPA, 1996. p. 323-330.

FROESY, R.; PAULY, D. **FishBase**. Endereço: <[www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)>  
Acesso em: 14 outubro de 2005.

GAZZOLA, A.C. **Efeito da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis***. 47 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

GOMES, L.C., et al. Effect of salt in the water for transport on survival and on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 1-9. Dec. 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3<sup>o</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. 543p.

HAZON, N.; BALMENT, R. J. Endocrinology. Evans, D. H. (ed). **The physiology of fishes**. 2<sup>o</sup> ed. New York, CRC Press, 1997. p. 441-461.

HENGSAWAT, K.; WARD, F.J.; JARURATJAMORN, P. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish

(*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. **Aquaculture**, v. 152, n. 1-4, p. 67-76, June. 1997.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 4, p. 537-556, Dec. 2002.

HOSHIBA, M.A. Respostas fisiológicas do piau (*Leporinus friderici*) submetidos ao manejo de captura. In: ANAIS. **AquaCiência**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006. CD-ROM.

HOSHIBA, M.A.; GONÇALVES, F.D.; URBINATI, E.C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, 445-452. 2009.

HYLANDER, L.D., et al. Fish mercury increase in Lago Manso, a new hydroelectric reservoir in tropical Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 81, n. 2, p. 155-166, Oct. 2006.

IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; VIJAYAN, M.M. Stress in fish. In: **AquaNet Workshop on Fish Welfare**, Canada, Campbell River, 2004. p. 1-9.

IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; VIJAYAN, M.M. Stress in fish. In: Evans, D. H.; Claiborne, J. B. **The physiology of fishes**. United States: Taylor & Francis, 2005. p. 319-342.

JENTOFT, S., et al. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 41, n. 3, p. 353-358, July. 2005.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall. 1994. 309p.

KJARTANSSON, H., et al. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. **Aquaculture**, v. 73, p. 261-274. 1988.



KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Ed. do Autor, 2000. 289p.

KUBÍLAY, A.; ULUKÖY, G. The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Turk Journal Zoology**, v. 26, p. 249-254, 2002.

LIMA, L.C., et al.. Estresse em peixes. Revista Brasileira de Reprodução Animal. **Belo Horizonte**, v. 30, n. 3-4, p. 113-117, jul./dez. 2006.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656-666. 2001.

LUZ-AGOSTINHO, K.D.G., et al. Influence of flood pulses on diet composition and trophic relationships among piscivorous fish in the upper Paraná River floodplain. **Hydrobiologia**, v. 607, p. 187-198. 2008.

MACHADO, C. **Aspectos reprodutivos do dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) (Teleostei, Characidae) na região do Alto Rio Uruguai, Brasil**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

MACHADO, C.C. **Exigência protéica de alevinos de dourado *Salminus brasiliensis***. 2004. 33 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MAI, M.G. **Efeito da idade de estocagem em tanques externos no desempenho da larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis***. Florianópolis, 2004. 31 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MAI, M.G.; ZANIBONI-FILHO, E. The effect of storage age in external tanks in the larviculture performance of *Salminus brasiliensis* (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 287-296, Apr./June. 2005.

MARSHALL, W.S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans, D.H.; Claiborne, J.B. (eds). **The physiology of fish**. United States: Taylor & Francis Web, 2005. p. 177-230.

MARTINEZ, C.B.R., et al. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 64, n. 4, p. 797-807, Nov. 2004.

MARTÍNEZ, F.J. et al. Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): simultaneous influence of various factors. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107A, n. 1, p. 95-100. 1994.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., MORALES, A.E., SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1-2, p. 75-88. Feb. 2005.

MARTINS, M.L., et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.30, n. 1, p. 71-80, 2004.

MARTINS, M.L., et al. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 macho X *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 195-204. 2002.

MAZUR, C.F.; IWAMA, G.K. Effect of handling and stocking density on hematocrit, plasma cortisol, and survival in wild and hatchery-reared chinook salmon (*Onchorynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 112, n. 4, p. 291-299. 1993.

MEURER, S., et al. Peixes. In: Cherem, J. J.; Kammers, M. **A fauna das áreas de influência da usina hidrelétrica Quebra Queixo**. Erechim: Habilis, 2008. p. 15-25.

MCCORMICK, S.D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. **American Zoologist**, v. 41, n. 4, p. 781-794. 2001.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n.3, p. 211-268. 1999.

MONTERO, D. et al. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.20, n. 1, p. 53-60, Jan. 1999.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 343-386.

MORAES, G., et al. Metabolic effects of exercise in the golden fish *Salminus maxillosus* “dourado” (Valenciennes, 1849). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3B, p. 655-660, 2004.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. 2 ed. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 1995. 204 p.

OZÓRIO, R.; AVNIMELECH, Y.; CASTAGNOLLI, N. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: Cyrino, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo, TecArt, 2004. p. 7-24.

PAPOUTSOGLOU, S.E.; TZIHA, G., VRETTOS, X; ATHANASIOU, A. Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. **Aquacultural Engineering**, v. 18, n. 2, p. 135-144. 1998.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Doenças de peixes, profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: EDUEM, 1998. 264p.

PIAIA, R.; BALDISSEROTTO, B. Densidade de estocagem de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 509-513. 2000.

RAMSAY, J.M. et al. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 565-574. 2006.

RANZANI-PAIVA, M.J.T., et al. Clotting time and hematocrit of “dourado”, *Salminus maxillosus*, and carp, *Cyprinus carpio*. **Boletim Instituto Pesca**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 113-116. 2000.

RIBEIRO, D.F.O. **Alimentação de pós-larvas de dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) em viveiros d piscicultura**. 2005. 36 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

RIBEIRO, D.F.O.; NUÑER, A.P.O. Feed preferences of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) larvae in fish ponds. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 65-71. Jan. 2008.

ROCHA, R.M.; CARVALHO, E.G.; URBINATI, E.C. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 3, p. 245-249. 2004.

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia da cavidade bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 41-50, mar. 2006.

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 65-75, jun. 2008.

RUANE, N.M. **Stress and stress disorders in a teleost fish, the common car *Cyprinus carpio* L.** 2002. 160 f. Dissertation. Fish Culture & Fisheries Group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, Netherlands. 2002.

RUANE, N.M.; CARBALLO, E.C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.) **Aquaculture Research**, v. 33, n. 10, p. 777-784. 2002.

RUANE, N.M.; KOMEN, H. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increasing loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 218, n. 1-4, p. 685-693. 2003.

RUDNEVA, I.I. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleost. Comparative Biochemistry and Physiology. **Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 118, n. 2, p. 255-260, Oct. 1997.

SADO, R.Y., et al. Hematologia de juvenil de dourado *Salminus brasiliensis* estocados em diferentes densidades. In: ANAIS. **AquaCiência**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006. CD-ROM.

SAMPAIO, J.M.C.; BRAGA, L.G.T. Cultivo de tilápia em tanques-rede na barragem do Ribeirão de Saloméa – Floresta Azul – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 6, n.2, p. 42-52. 2005.

SANTOS, J.E.; GODINHO, H.P. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Curvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 163-171, Mar. 2002.

SCHÜTZ, J.H. **Avaliação de diferentes tipos de alimentos e fotoperíodos no crescimento e na sobrevivência de pós-larvas de dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae)**. 2003. 29 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCHÜTZ, J.H.; NUÑER, A.P.O. Growth and survival of dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 435-444. May. 2007.

SERAFINI, R.L. **Efeito do oxigênio dissolvido e da amônia na sobrevivência e crescimento de juvenis de dourado, *Salminus brasiliensis***. 2005. 33 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SEVGILER, Y.; ORUÇ, E.Ö.; ÜNER, N. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 1, p. 1-8. Jan. 2004.

SILVA, P.C., et al. Efeito da densidade de estocagem no crescimento da tilápia vermelha tetrahíbrida (linhagem de Israel). In: FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE. Rio de Janeiro: SRG Gráfica & Editora Ltda, 2000, v. 2, p. 341-345.

SOUZA, R.A.L. et al. Determinação da densidade de estocagem de alevinos de tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Pisces; Characidae) no Estado do Pará – Brasil. **Boletim Técnico do CEPTA**, v.11, p.39- 48, 1998.

STREIT Jr., D.P., et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 337-344. 2008.

STREIT, A.A.R. **Efeito da exposição crônica à amônia (NH<sub>3</sub>) no crescimento e nas aminotransferases de juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*)**. 2006. 24 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SOUZA FILHO, J.J.S. **Influência da densidade de estocagem no cultivo de juvenis do robalo *Centropomus undecimalis* Bloch, 1792 (Pisces: Centropomidae) em condições controladas**. 2000. 67 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

TAVARES-DIAS, M., et al. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (CHARACIDAE) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 43-48. 2001.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of Brazilian teleost. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo state, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n. 2, p.109-115. 2003.

TEIXEIRA, B. **Concentração protéica na dieta durante a fase inicial de alevinagem de dourado, *Salminus brasiliensis*: crescimento, composição corporal e eficiência de utilização da proteína dietética.** 2006. 30 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

THOMAS, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. In: Adams, S.M. (ed.). **Biological indicators of stress in fish.** American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 1990. p. 9-28.

TUOMOLA, L., et al. Fish mercury development in relation to abiotic characteristics and carbon sources in a six-year-old, Brazilian reservoir. **Science of The Total Environment**, v. 390, n. 1, p. 177-187, Feb. 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Biblioteca Universitária. Guias e Normas. Referência. **Como fazer referências (bibliográficas, eletrônicas e demais formas de documentos).** Disponível em: < <http://www.bu.ufsc.br>>. Acesso em: janeiro de 2010.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: Cyrino, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo, TecArt, 2004. p. 171-194.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. 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.

VAN DE NIEUWEGIESSEN, P.G., et al. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. **Applied Animal Behaviour Science**, v.115, n. 3, p. 233-243. 2008.

VEGA-ORELLANA, O.M.; FRACALOSSO, D.M.; SUGAI, J.K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. **Aquaculture**, v. 252, n. 2-4, p. 484-493. Mar. 2006.

VEIGA, M.L. Alterações histopatológicas em fígado de dourado *Salminus maxillosus* VALENCIENNES, 1840 causadas por *Neocucullanus neocucullanus* (NEMATODA). **Boletim do Instituto de Pesca**, APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Governo do Estado de São, n. 1. Disponível em: <  
<http://www.cienciared.com.ar/ra/doc.php?n=256>>. Acesso em:  
 dezembro 2009.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R., et al. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 87, p. 305-313, Oct. 2006.

VIJAYAN, M.M.; BALLANTYNE, J.S.; LEATHERLAND, J.F. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 82, n. 3, p. 476-486, June. 1991.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137-150. 2009.

VOSYLIENÈ, M.Z.; KAZLAUSKIENÈ, N. Alterations in fish health state parameters after exposure to different stressors. **Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia**, v. 9, n. 2, p. 83-94. 1999.

WAGNER, E.J. et al. Effects of rearing density upon cutthroat trout hematology, hatchery performance, fin erosion, and general health and condition. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 59, n. 3, p. 173-187, July. 1997.

WANG, C.; WILLIAM, K.V.; W, L.C. Physiological indicators of divergent stress responsiveness in male striped bass broodstock. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 665-678, Apr. 2004.

WANG, NING; HAYWARD, ROBERT S., NOLTIE, DOUGLAS B. Effects of social interaction on growth of juvenile hybrid sunfish held at two densities. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 3, p. 161-167. May. 2000.



WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. CHAPMAN & HALL, 1996. 232p.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: Baldisserotto, B.; Gomes, L. C. (org). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria, UFSM, 2005. p. 257-286.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n.3, p. 591-625, 1997.

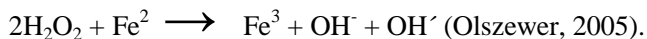
ZANIBONI-FILHO, E. et al. Espécies nativas com potencial para regiões de clima frio. **Panorama da Aqüicultura**, v. 19, n. 114, p. 24-29, jul./ago. 2009.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: Cyrino, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo, TecArt, 2004. p. 239-266.

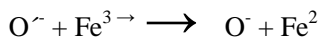


## ANEXO I

Reação de Fenton: o peróxido de hidrogênio se combina diretamente com o íon ferroso que se reduz a íon férrico.



Reação de Haber-Weiss: o peróxido de hidrogênio interage com os superóxidos (que não foram desmutados pela enzima superóxido dismutase), com a participação do íon férrico.



## ANEXO II

Os alevinos de dourado (*Salminus brasiliensis*) utilizados nos experimentos foram, quando larvas, mantidas em incubadoras após as desovas, e ali permaneceram por uma semana, tendo sido alimentadas com larvas forrageiras (grumatão, *Prochilodus lineatus*) e alimento inerte a partir do terceiro dia e realizada seleção por tamanho, diariamente. Posteriormente foram transferidas para tanques de terra, onde foram alimentadas com larvas forrageiras e ração (42% proteína). Após um mês os peixes foram transportados para o LAPAD, onde receberam banho profilático com antibiótico e sal e foram separados em grupos homogêneos em comprimento e estocados em tanques circulares na densidade de 0,1 peixe m<sup>-3</sup> (80 peixes em 800 L). Nesses tanques os alevinos foram aclimatados por um período de três semanas, tendo sido mantidos em temperatura média de 26 (± 1,5) °C e concentração de oxigênio dissolvido de 6,5 mg L<sup>-1</sup> (± 0,7). Nessa fase os peixes receberam ração comercial com 42% de proteína.

## ANEXO III

Tabela 6. Número de alevinos de *Salminus brasiliensis* e volume de água utilizado nos experimentos com presente/ausência de manuseio em laboratório.

Manuseio	Peixes m <sup>-3</sup>	Dias de cultivo	Número de alevinos/UE	Volume água (L)/UE
Presente	30	Até 20	18	600
	150	Até 20	27	180
	300	Até 20	48	160
	30	20 até 40	15	500
	150	20 até 40	24	160
	300	20 até 40	45	150
	30	40 até 60	12	400
	150	40 até 60	21	140
	300	40 até 60	42	140
	30	60 até 80	9	300
	150	60 até 80	18	120
	300	60 até 80	39	130
Ausente	30	80	18	600
	150	80	27	180
	300	80	48	160

UE = unidade experimental

## ANEXO IV

Tabela 7. Cálculos para determinação das concentrações de glicose, lactato, hemoglobina [Hb] e do hematócrito (Ht).

Parâmetro	Fórmula utilizada para o cálculo
Glicose ( $\text{mg dl}^{-1}$ ) =	$[(\text{média da absorbância da amostra} / \text{média da glicose padrão em } \text{mg dl}^{-1} * (100/ 2)]$
Lactato ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) =	$[(\text{média da absorbância da amostra} / 6,22) / * (\text{volume cubeta } \mu\text{l} / \text{volume do plasma})]$
[Hb] (mM) =	$[(\text{média da absorbância da amostra} / \text{volume amostra em } \mu\text{l}) * (\text{volume final em } \mu\text{l} / \text{epsilon})]$
Ht (%) =	% da sedimentação dos eritrócitos em cartão padronizado

Epsilon = 44 nm

## ANEXO V

Tabela 8. Cálculos para determinação dos valores dos íons através das equações obtidas da curva padrão.

Íons	Fórmulas utilizadas para o cálculo
Plasmáticos	
Cl <sup>-</sup>	= [(2187,3 x - 82,041)*d]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,98)
Na <sup>+</sup>	= [(83,988 x - 5,6729)*d]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,99)
K <sup>+</sup>	= [(17,584 x - 9,3797)*d]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,99)
Ca <sup>2+</sup>	= [(15,822 x - 4,0138)*d]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,99)
Branquiais	
Cl <sup>-</sup>	= [(2129 x - 38,37)*d1*d2]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,97)
Na <sup>+</sup>	= [(21,126 x - 22,172)*d1*d2]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,99)
K <sup>+</sup>	= [(12,748 x - 1,2205)*d1*d2]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,99)
Ca <sup>2+</sup>	= [(15,52 x - 0,9235)*d1*d2]/1000 (R <sup>2</sup> = 0,99)

d = diluição (801; 801; 34,33; 31 µl respectivamente)

d1 = diluição 1 (4 µl)

d2 = diluição 2 (161 µl)

1000 = transformação de µmol/l em mmol/l

## ANEXO VI

Tabela 9. Cálculos para determinação da atividade enzimática da glutatona peroxidase (GPx), da glutatona transferase (GST), da glutatona reduzida (GR) e da catalase (CAT).

Enzima	Fórmula utilizada para o cálculo
GPx (nmol min <sup>-1</sup> mg de proteína)	$(((\text{média da absorbância da amostra} - \text{média da absorbância basal}) - 1 / \text{epsilon}^1) * (\text{volume cubeta } \mu\text{l} / \text{volume amostra } \mu\text{l}) / [\text{proteína}] \text{ mg/ml})$
GST (nmol min <sup>-1</sup> mg de proteína)	$(((\text{média da absorbância da amostra} - \text{média da absorbância basal}) / \text{epsilon}^2) * (\text{volume cubeta } \mu\text{l} / \text{volume amostra } \mu\text{l}) / [\text{proteína}] \text{ mg / ml})$
GR (nmol min <sup>-1</sup> mg de proteína)	$(((\text{média da absorbância da amostra} - \text{média da absorbância basal}) - 1 / \text{epsilon}^3) * (\text{volume cubeta } \mu\text{l} / \text{volume amostra } \mu\text{l}) / [\text{proteína}] \text{ mg/ml})$
CAT = ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg de proteína)	$(((\text{média da absorbância da amostra} - 1) / \text{epsilon}^4) * (\text{volume cubeta } \mu\text{l} / \text{volume amostra } \mu\text{l}) / [\text{proteína}] \text{ mg / ml})$

Epsilon = <sup>1</sup>0,00622 ; <sup>2</sup>0,0096; <sup>3</sup>0,00622 e <sup>4</sup>0,04  $\mu\text{M}$

<sup>2</sup>O cálculo da proteína foi obtido através do programa Simple Read - Concentration Analysis Report (mg/ml)



## ANEXO VII

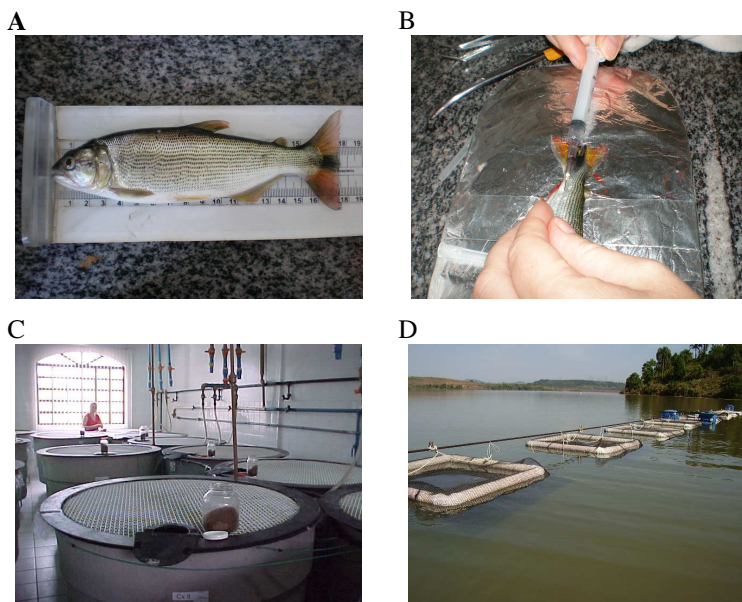


Figura 8. (A) Alevino de *Salminus brasiliensis*; (B) coleta de sangue com seringa heparinizada; (C) unidades experimentais de cultivo em laboratório e (D) tanques redes no reservatório de Itá.