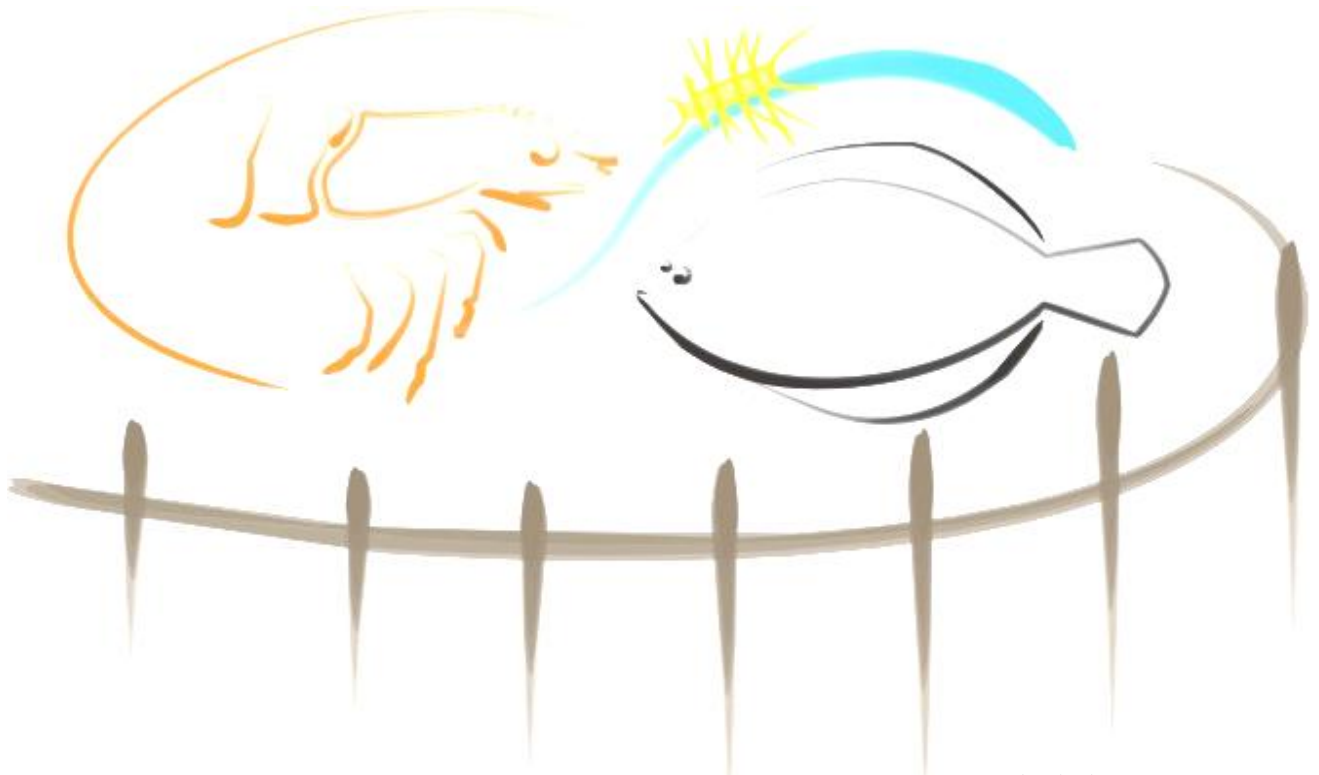




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



TRANSPORTE DE JUVENIS DE LINGUADO *Paralichthys orbignyanus* (VALENCIENNES, 1839): EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO AR

JESSICA CAROLINA TESKE

RIO GRANDE-RS

2016

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Oceanografia
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**TRANSPORTE DE JUVENIS DE LINGUADO *Paralichthys*
orbignyanus (VALENCIENNES, 1839): EFEITOS DA EXPOSIÇÃO
PROLONGADA AO AR**

JESSICA CAROLINA TESKE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura
no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Orientador: Dr. Luís André Sampaio

Rio Grande - RS - Brasil

Agosto, 2016

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 7 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 7 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 7 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 7 |
| 3.1. Local de Estudo e Obtenção dos Animais..... | 7 |
| 3.2. Delineamento Experimental..... | 8 |
| 3.3. Coleta de Material Biológico..... | 8 |
| 3.4. Análises Hematológicas..... | 9 |
| 3.5. Análises Bioquímicas..... | 9 |
| 3.6. Análise de qualidade da água..... | 11 |
| 3.7. Análises Estatísticas..... | 11 |
| 4. RESULTADOS..... | 12 |
| 4.1. Respostas secundárias do estresse..... | 12 |
| 4.2. Capacidade antioxidante total contra radical peroxil (ACAP)..... | 15 |
| 4.3. Lipoperoxidação lipídica (TBARS)..... | 16 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 18 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 26 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 26 |

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que fazem da ciência uma forma de progresso para a humanidade, e humildemente estão sempre dispostos a aprender. A minha família que com todo seu amor e dedicação me apoiam nesta linda jornada de aprendizado que é a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que por alguns minutos, ou mesmo anos, compartilharam seu conhecimento comigo, e que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao meu orientador Dr. Luís André Nassr de Sampaio pelos ensinamentos, paciência, auxílio, ajuda e por disponibilizar os recursos necessários para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, o qual me auxiliou em todo o processo deste trabalho, sempre disposto a me ajudar, me ensinar e sanar as minhas dúvidas.

Ao Dr. José María Monserrat pelo auxílio com as análises de estresse oxidativo, ajuda e por sempre estar disposto a tirar minhas dúvidas.

Aos integrantes do Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha pelas inúmeras ajudas ao decorrer destes dois anos, especialmente ao Mário Davi, Janaína Pedron, Marcelo Okamoto, Ivanildo dos Santos e Thamyres Vanessa, e aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

A todos meus amigos: Bárbara, Michele, Gabriele, Amanda, Victor, Mário, Denis, Dedi, Joseane, Laura e Elisa pelos bons momentos no Cassino.

Ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao corpo docente, técnicos, discentes e demais profissionais do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, da Estação Marinha de Aquicultura/FURG.

Especialmente a minha família, Fabiani, Heleno, Maria e João pelo amor incondicional, e por me apoiarem em todos os momentos da minha vida, estando sempre presente, mesmo tendo quilômetros de distância nos separando.

1 RESUMO

2 As alterações nos parâmetros físico-químicos da água durante o transporte de peixes
3 vivos, e os altos custos relacionados a essa atividade, tornam importante o estudo para
4 aprimorar e desenvolver novas tecnologias de transporte. O presente trabalho estudou a
5 possibilidade de transportar juvenis de linguado *Paralichthys orbignyanus* sem água ou
6 a “seco” de forma simulada, avaliando respostas secundárias do estresse e a
7 sobrevivência. Os peixes (26 ± 2 cm; 227 ± 37 g) foram mantidos em jejum por 24 h e
8 em seguida submetidos à redução da temperatura da água de 23 °C para 10 °C (1 °C/h),
9 quando então, foram embalados para o transporte: com água (TA) e a seco (TS). O
10 transporte teve duração de 10 h e a temperatura foi mantida a 10 °C. Foram realizadas
11 coletas de sangue para avaliar as respostas secundárias do estresse; no fígado, músculo e
12 brânquias foram avaliados o dano oxidativo lipídico (TBARS) e capacidade
13 antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP). Os juvenis foram amostrados nos
14 tempos 0 h, 1 h e 24 h após o transporte. A sobrevivência foi de 100% nos dois
15 tratamentos. Apenas peixes do tratamento TS aumentaram a glicemia logo após o
16 transporte, enquanto as concentrações de lactato e hematócrito não diferiram entre os
17 tratamentos após o transporte e durante a recuperação. A osmolalidade e a concentração
18 de Cl^- em TS foram maiores logo após o transporte e 1 h após a chegada em relação ao
19 TA. A concentração de K^+ foi menor em TA ao fim do transporte, enquanto a
20 concentração de Na^+ foi reduzida em TA ao longo de 24 h. Após 24 h, não foi
21 observada diferença em nenhum parâmetro entre os tratamentos. A competência
22 antioxidante no fígado apresentou um aumento transitório após 1 h do transporte em
23 TA, porém em ambos os tratamentos não houve diferenças na ACAP em 24 h. As
24 brânquias tiveram oscilações pontuais na ACAP, enquanto o músculo manteve os
25 valores de ACAP inalterados ao longo do experimento. No entanto, não foi observado
26 dano oxidativo lipídico em nenhum tecido em ambos os transportes. Os resultados
27 indicam que é viável o transporte de linguado sem água por até 10 h e o transporte em
28 água na densidade de 68 g/L, visto que não houve mortalidade. Em adição, o transporte
29 a seco pode representar uma redução de até três vezes no custo do transporte de peixes
30 vivos.

31 **PALAVRAS CHAVES:** alterações fisiológicas, confinamento, defesas antioxidantes,
32 parâmetros bioquímicos.

33 **ABSTRACT**

34 Variations in water quality parameters during and after live fish transport, and the high
35 costs related for this activity, make it an important point for research, to improve and
36 develop new technologies. The present study aimed to evaluate secondary stress
37 responses and survival of juvenile flounder *Paralichthys orbignyanus* at simulated
38 transport in water or in dry environment. To achieve that, juveniles (26 ± 2 cm; $227 \pm$
39 37 g) were fasted for 24 hours and then submitted to a progressive decrease in water
40 temperature from 23 °C to 10 °C (1 °C/ hour). Subsequently the fish were packed for
41 transport in the following conditions: with water (TA) and dry (TS). The transport
42 lasted 10 h and the temperature was maintained at 10 °C. Blood samples were collected
43 to evaluate the secondary stress responses; liver, muscle and gills were sampled to
44 evaluate lipid peroxidation (TBARS) and total antioxidant capacity against peroxy
45 radicals (ACAP). Furthermore, juveniles were sampled at 0 h, 1 h, and 24 h after
46 transport and subsequently stocked in recovery tanks. The survival rate was 100% in
47 both treatments. Fish from TS treatment increased blood glucose levels after transport,
48 while lactate and hematocrit levels did not differ in both transports and during the
49 recovery. Osmolality and Cl⁻ concentration in TS were higher after transport and 1 h
50 after recovery in comparison with TA. The K⁺ levels decreased in TA after transport,
51 while the Na⁺ levels decreased during 24 hours in the recovery at TA. After 24 hours,
52 no differences were observed in any parameter between treatments. The total
53 antioxidant capacity in liver showed a transient increase in TA at 1 h after transport, but
54 the ACAP in both treatments no changes after 24 hours. We verified variations in
55 ACAP measured in gills, and the muscle ACAP remained unchanged. No changes were
56 observed in lipid peroxidation in any tissue at both transports. The results indicate that it
57 is possible to transport juvenile flounder in dry conditions for 10 h, and stocking density
58 for transport in water can reach 68 g /L, since no mortality was observed. In addition,
59 the cost of flounder transported in water is 3 times more expensive, therefore it is
60 recommended to transport flounder without water.

61 **KEY WORDS:** antioxidant defenses, biochemical parameters, confinement,
62 physiological changes.

63

64 1. INTRODUÇÃO

65 Em 2014 a aquicultura foi responsável por 73,8 milhões dos 167,2 milhões de
66 toneladas de organismos aquáticos consumidos, representando 44,1% do valor total.
67 Dentre os organismos cultivados, aproximadamente 49,8 milhões de toneladas eram de
68 peixes (67,4%). A projeção para os próximos anos é de um aumento da proteína animal
69 proveniente da aquicultura (FAO, 2016), e conseqüentemente haverá um aumento das
70 atividades relacionadas à produção aquícola, como o transporte de animais.

71 O transporte de peixes vivos é utilizado para diferentes fins, como o
72 deslocamento de animais para laboratórios de reprodução; transferência de juvenis para
73 os tanques de engorda; transporte de peixes da engorda para o
74 processamento/beneficiamento; ou até mesmo para a comercialização de peixes vivos
75 em feiras e mercados (Berka, 1986; Lee & Sadovy, 1998; Lim *et al.*, 2003; Nomura *et*
76 *al.*, 2009; Shabani *et al.*, 2016).

77 A aquicultura apresenta uma variedade de técnicas de transporte, podendo ser
78 realizado por meio do sistema fechado, que consiste em transportar os organismos em
79 sacos plásticos com água e oxigênio dissolvido, geralmente na proporção de 1:2, ou por
80 meio do transporte em sistema aberto, no qual há fornecimento constante de
81 aeração/oxigênio em caixas de transporte (Berka, 1986; Lim *et al.*, 2003). No sistema de
82 transporte aberto as alterações da água tendem a ser menores que no sistema fechado,
83 visto que o fornecimento de ar/oxigênio pode ser controlado, o que minimiza a redução
84 de níveis de oxigênio dissolvido na água (hipóxia), o acúmulo de dióxido de carbono e
85 conseqüentemente redução do pH (Lim *et al.*, 2003; Shabani *et al.*, 2016). Ambas as
86 formas de transporte podem ser realizadas por via aérea, terrestre ou aquílica (Berka,
87 1986; King, 2009).

88 Os sistemas de transporte devem fornecer todo suporte necessário para manter os
89 peixes vivos durante e após o transporte (King, 2009). O transporte de peixes vivos
90 requer uma série de cuidados, principalmente em relação aos parâmetros físico-
91 químicos da água, que tendem a se alterar durante o transporte (Berka, 1986; Lim *et al.*,
92 2003; Shabani *et al.*, 2016). O fornecimento de níveis adequados de oxigênio dissolvido
93 é um fator importante durante o transporte, e está relacionado com outras variáveis,
94 como a temperatura da água e densidade de estocagem durante o transporte, que varia

95 conforme a espécie e a habilidade do peixe para tolerar o estresse (Berka, 1986; Lim *et*
96 *al.*, 2003).

97 Outro aspecto importante durante o transporte de peixes é a concentração do
98 dióxido carbono (CO₂), que tende a se acumular principalmente no transporte de peixes
99 em sistema fechado e que é um dos principais resíduos metabólicos produzidos durante
100 o transporte, gerado pela respiração dos organismos (Berka, 1986; Shabani *et al.*, 2016).
101 O CO₂ influencia no equilíbrio do pH, sendo que concentrações elevadas de CO₂
102 tornam o pH mais ácido. O acúmulo de amônia é resultado da excreção dos peixes e se
103 apresenta de duas formas, como amônia ionizada (NH₄⁺) e amônia não ionizada (NH₃)
104 (Lim *et al.*, 2003; Wright & Wood, 2012). O pH por sua vez age diretamente no
105 equilíbrio da amônia na água, favorecendo a forma não ionizada quando há aumento do
106 pH.

107 A queda na qualidade da água durante o transporte pode afetar diversos aspectos
108 fisiológicos dos peixes (Barton, 2002; Sampaio & Freire, 2016; Shabani *et al.*, 2016). O
109 transporte é uma atividade que gera estresse, levando a diversas respostas metabólicas
110 (Barton & Iwama, 1991), podendo refletir até na qualidade final do pescado, como
111 alteração da textura, sabor e cor (Skjervold *et al.*, 2001).

112 O estresse pode ser definido como a resposta a um estímulo, sendo que esta
113 resposta pode de alguma forma alterar o estado homeostático do peixe (Barton &
114 Iwama, 1991). Estas respostas podem ser ocasionadas por meio de estímulos químicos
115 (contaminação e exposição a poluentes, acidificação e baixos teores de oxigênio da
116 água), biológicos (densidade de estocagem inadequada), ou físicos (manejo,
117 confinamento, captura e transporte) (Barton, 2002). As alterações fisiológicas
118 ocasionadas pelo estresse agem em cascata, desencadeando uma serie de respostas,
119 conhecidas na literatura como resposta primária, secundária e terciária (Barton & Iwama
120 1991; Barton, 2002).

121 As respostas primárias resultam no aumento das catecolaminas (adrenalina e
122 noradrenalina) produzidas nas células cromafins, e ação do eixo hipotálamo-pituitária-
123 interrenal (HPI), aumentando a liberação dos hormônios corticosteróides (cortisol)
124 produzidos nas células interrenais (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

125 As respostas secundárias incluem mudanças metabólicas como o aumento da
126 glicose, lactato e diminuição do glicogênio nos tecidos, aumento da produção de HSP

127 (Heat Shock Protein), distúrbios osmorregulatórios, alterações hematológicas como o
128 hematócrito e leucócitos, além de afetar o sistema imunológico (Iwama, 1998; Barton,
129 2002). As respostas terciárias refletem no desempenho animal, afetando o crescimento,
130 reprodução, resistência a doenças, e sobrevivência (Wendelaar Bonga, 1997; Barton,
131 2002; Schulte, 2014).

132 Muitos estudos vêm sendo realizados para avaliar diferentes formas de
133 transporte que garantam o bem-estar dos peixes (Barton, 2002; Lim *et al.*, 2003;
134 Harmon, 2009; King, 2009). Diferentes respostas bioquímicas são utilizadas a fim de
135 avaliar as alterações fisiológicas diante a uma determinada circunstância, como níveis
136 de cortisol, glicose e lactato (Hur *et al.*, 2007; Gesto *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015).
137 Outra alteração bioquímica do metabolismo utilizado para organismos aeróbios é a
138 relação entre espécies pró e antioxidantes (Blier, 2014; Gao *et al.*, 2014).

139 Os estudos com estresse oxidativo em peixes avaliam o efeito de xenobióticos
140 (Slaninova *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2011), aumento de temperatura no ambiente
141 (Grim *et al.*, 2010; Vinagre *et al.*, 2012; Madeira *et al.*, 2016) e efeitos de
142 hipóxia/anóxia seguidos de reoxigenação (Lushchak, 2011; Hermes-Lima *et al.*, 2015).
143 Ainda são poucos os estudos avaliando o efeito das atividades relacionadas à
144 aquicultura no estresse oxidativo de peixes (Castro *et al.*, 2012; Shim *et al.*, 2012),
145 principalmente o efeito do transporte. Azambuja *et al.* (2011) e Salbego *et al.* (2014)
146 avaliaram o efeito do uso de anestésicos durante o transporte de *Rhamdia quelen* nos
147 parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo. No entanto, pouco se sabe
148 sobre o efeito de diferentes formas de transporte nos parâmetros bioquímicos em outras
149 espécies de peixes.

150 Os organismos aeróbicos geram radicais livres e espécies reativas de oxigênio
151 (ROS). Estas substâncias são produzidas por diferentes tecidos pela redução do
152 oxigênio molecular (O₂) (Halliwell & Whiteman, 2004). Os radicais livres e espécies
153 reativas de oxigênio (ROS), tais como, radical ânion superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila
154 (•OH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) participam de uma serie reações, onde vários
155 metabolitos reativos são formados. Estes metabolitos são gerados naturalmente na
156 respiração mitocondrial, devido ao “escape” de elétrons da cadeia transportadora, ou por
157 alguma disfunção biológica (Halliwell & Whiteman, 2004; Slaninova *et al.*, 2009;
158 Ďuračková, 2010). A fim de remediar os efeitos negativos causados pelos radicais livres

159 e ROS, os animais desenvolveram mecanismos de defesa conhecido como sistema
160 antioxidante, essencial para manter o estado redox (Slaninova *et al.*, 2009; Ďuračková,
161 2010).

162 O sistema de defesa antioxidante é classificado em enzimático e não enzimático.
163 Os antioxidantes enzimáticos são a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD),
164 glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (Gr), glutathione S-transferase (GST).
165 Estas são sintetizadas pelo próprio organismo (Halliwell & Whiteman, 2004; Martínez-
166 Álvarez *et al.*, 2005). Já os antioxidantes não enzimáticos podem ter origem exógena ou
167 dietética como o β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides e α -tocoferol
168 (vitamina E) (Halliwell & Whiteman, 2004). Estas substâncias têm função de retardar,
169 impedir ou remover o dano oxidativo das moléculas alvo (Halliwell & Whiteman, 2004;
170 Martínez- Álvarez *et al.*, 2005; Slaninova *et al.*, 2009; Ďuračková, 2010).

171 O excesso de radicais livres e ROS podem alterar o estado redox. Se a ação pró-
172 oxidante superar a ação antioxidante ocorre o estresse oxidativo (Halliwell &
173 Whiteman, 2004). As mudanças no estado redox estimulam ou inibem a sinalização de
174 várias atividades proteicas, causam oxidação em proteínas; DNA e componentes
175 esteróides, bem como a oxidação de lipídeos poli-insaturados nas membranas celulares
176 (Martínez- Álvarez *et al.*, 2005; Lushchak, 2011; Hermes-Lima *et al.*, 2015). No
177 entanto, a presença de ROS e alguns radicais livres são necessários para a regulação e
178 sinalização celular, como a expressão de genes e reparação de processos de apoptose,
179 inflamação e proliferação celular (Slaninova *et al.*, 2009; Ďuračková, 2010).

180 No ambiente aquático o organismo está sujeito a diversas variações ambientais
181 (Hermes-Lima *et al.*, 2015). No caso do transporte de peixes, eles podem ser
182 submetidos a ambientes hiperóxicos, devido à saturação de oxigênio que é realizada na
183 água para manter níveis de O_2 elevados durante o transporte, bem como em ambientes
184 hipóxicos, decorrente do consumo de oxigênio e conseqüente redução dos níveis de
185 oxigênio dissolvido na água.

186 Os organismos oxirreguladores, em situação de hipóxia, aumentam a ventilação
187 branquial, a fim de elevar o volume de água que passa pelas brânquias e aumentar a
188 disponibilidade do oxigênio, ao contrário dos oxiconformadores, que reduzem a
189 ventilação branquial em situação de hipóxia, devido à capacidade de regular o consumo
190 de oxigênio conforme a disponibilidade do ambiente. Contraditoriamente, os peixes

191 oxirreguladores também podem reduzir a frequência do batimento cardíaco
192 (bradicardia), diminuindo o fluxo de sangue a fim de evitar o gasto de energia pelo
193 coração e permitir a manutenção de sangue para outros tecidos (Hughes, 1973).

194 A exposição à hipóxia aumenta a concentração da hemoglobina e o número de
195 eritrócitos a fim de facilitar a captação de oxigênio na água (Pollock *et al.*, 2007). Além
196 disso, exposições prolongadas à hipóxia afetam negativamente o sistema imune dos
197 organismos (Boleza *et al.*, 2001), bem como crescimento e reprodução (Wu, 2009).

198 O aumento de oxigênio no ambiente pode causar um excesso de produção de
199 ROS. Caso o sistema antioxidante do organismo não seja capaz de enfrentar essa
200 situação, poderá gerar estresse oxidativo (Lushchak, 2011). Já se sabe que o processo de
201 anóxia/ hipóxia seguido de reoxigenação causa alterações no balanço redox de animais
202 aquáticos (Lushchak *et al.*, 2001, 2005, Hermes-Lima *et al.*, 2015). O transporte de
203 elétrons na respiração mitocondrial é reduzido durante a isquemia, sendo que durante a
204 reoxigenação a cadeia de elétrons volta a sua atividade, mas aumenta a produção de
205 oxirradicais. Todavia, animais que naturalmente vivenciam variações de oxigênio no
206 ambiente podem apresentar adaptações fisiológicas e bioquímicas, como o controle do
207 uso de energia, como estratégia de sobrevivência diante o ambiente com pouca
208 disponibilidade de oxigênio (Lushchak, 2011; Hermes - Lima *et al.*, 2015).

209 A avaliação de mudanças bioquímicas, como a análise de antioxidantes e de
210 dano oxidativo em conjunto com outras análises de respostas ao estresse podem trazer
211 resultados interessantes para avaliar o bem-estar do peixe diante do transporte.
212 Martínez-Álvarez *et al.* (2002) verificaram que o esturjão *Acipenser naccarii* durante a
213 aclimatação à água salgada (0 a 35‰) e após 20 dias em recuperação na água com
214 salinidade de 35‰, restabeleceu os valores de osmolalidade e glicose no plasma. No
215 entanto, as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e a peroxidação lipídica no plasma
216 e nas células vermelhas não retornaram aos valores iniciais. O “turbot” *Scophthalmus*
217 *maximus* ao ser exposto a diferentes concentrações de nitrito durante 96 h não
218 apresentou diferenças nas concentrações plasmáticas de glicose entre os tratamentos.
219 Porém, as concentrações de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) foram reduzidas e
220 maior dano lipídico nas brânquias foi observado nas concentrações mais elevadas de
221 nitrito (Jia *et al.*, 2015).

222 O transporte é uma atividade de elevado custo e apresenta diversos riscos
223 relacionados à qualidade da água. Desta forma requer uma serie de cuidados, tanto para
224 minimizar os impactos causados pelo estresse, como para diminuir os riscos
225 relacionados a perdas econômicas (Lee & Sadovy, 1998). Diante deste contexto, é
226 importante estudar novas tecnologias para aprimorar o transporte de peixes (Sadovy *et*
227 *al.*, 2003; Shabani *et al.*, 2016).

228 Uma nova alternativa é o transporte a “seco” ou sem água, como já é realizado
229 com sucesso em crustáceos como o *Marsupenaeus japonicus* e o *Macrobrachium*
230 *rosenbergii* (Shigueno, 1992; Salin, 2005), e de forma comercial com o "turbot"
231 *Scophthalmus maximus* (Group Adrien, 2015). No entanto, informações científicas
232 relacionadas a este tipo de transporte em peixes são escassas, tendo um único trabalho
233 realizado por Martín *et al.* (2014) com boas perspectivas para essa técnica para
234 reprodutores de *Solea senegalensis*.

235 A comercialização de peixes vivos é tradicional em países do sudeste asiático,
236 portanto o transporte de peixes vivos é bastante comum nessa região (Erdman & Pet-
237 Soede, 1996; Lee & Sadovy, 1998). Um exemplo são os mercados de peixes de Hong
238 Kong, local com grande comercialização de pescados vivos, no qual 90% dos peixes
239 comercializados são importados e posteriormente redistribuídos, por meio do transporte
240 aéreo ou naval (Sim *et al.*, 2004). A comercialização de peixes vivos chega a aumentar de
241 duas até três vezes o valor de venda do pescado para o consumidor (Erdman & Pet-
242 Soede, 1996; Sadovy *et al.*, 2003; Sim *et al.*, 2004).

243 No Brasil a piscicultura marinha ainda é incipiente, porém diversos estudos têm
244 mostrado que o linguado *Paralichthys orbignyanus* tem potencial para a aquicultura
245 (Sampaio *et al.*, 2008). Essa espécie apresenta características interessantes, como
246 capacidade de tolerar ampla faixa de temperatura (Wasielesky *et al.*, 1998) e salinidade
247 (Sampaio & Bianchini, 2002), baixos valores de pH (Wasielesky *et al.*, 1997), bem
248 como concentrações elevadas de compostos nitrogenados (Bianchini *et al.*, 1996), além
249 de ser uma espécie euritérmica logo após a metamorfose (Okamoto & Sampaio, 2012),
250 o que o caracteriza como um peixe rústico. Além disso, já existe um protocolo de
251 produção de juvenis do linguado em cativeiro (Sampaio *et al.*, 2008), que faz com que
252 essa espécie seja promissora para o desenvolvimento da piscicultura marinha no Brasil.

253 O transporte a “seco” ou sem água já é realizado em atividades aquícolas,
254 porém, há poucas informações na literatura sobre o transporte de peixes dessa forma. O
255 presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial do transporte do linguado *P.*
256 *orbignyanus* a “seco” em relação ao transporte convencional com água, bem como as
257 possíveis alterações fisiológicas ocasionadas por essa forma de transporte.

258 **2. OBJETIVOS**

259 **2.1. Objetivo Geral**

260 Avaliar a possibilidade do transporte a seco de juvenis do linguado *Paralichthys*
261 *orbignyanus*.

262 **2.2. Objetivos Específicos**

263 a) Avaliar a sobrevivência de juvenis de linguado em transporte simulado a seco
264 em comparação com o transporte simulado em água;

265 b) Estudar as respostas secundárias de estresse sanguíneas: hematócrito, glicose
266 lactato, osmolalidade e íons (cloreto, potássio e sódio);

267 c) Avaliar alterações bioquímicas em termos de resposta antioxidante e dano
268 oxidativo no fígado, músculo e brânquias frente às diferentes simulações de transporte.

269 **3. MATERIAL E MÉTODOS**

270 **3.1. Local de Estudo e Obtenção dos Animais**

271 O experimento foi realizado com 54 juvenis de linguado *P. orbignyanus* (26 ± 2
272 cm; 227 ± 37 g) produzidos no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha
273 (LAPEM) da FURG. Os peixes foram mantidos em tanques com volume útil de 8.000
274 litros, em sistema de recirculação de água (RAS), em condições controladas de
275 fotoperíodo (14 h claro: 10 h escuro), temperatura ($23 \pm 0,2$ °C), salinidade (26‰) e
276 aeração constante. Os juvenis foram alimentados duas vezes ao dia *ad libitum* com
277 ração comercial (50% proteína bruta e 10% de lipídeos) até a realização do
278 experimento.

279 Os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão
280 de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Rio Grande (Protocolo n°
281 Pq00512016).

282

283

284 **3.2. Delineamento Experimental**

285 Os juvenis de linguado foram divididos em dois tratamentos: transporte com
286 água (TA) e transporte a seco (TS). Os animais utilizados no experimento foram
287 submetidos a 24 h de jejum. Posteriormente os juvenis foram distribuídos
288 aleatoriamente em dois tanques de 300 L, para a redução da temperatura da água de 23
289 °C para 10 °C (1 °C/h), com adição de bolsas de gelo marinho na água.

290 Após o processo de redução da temperatura, um grupo de 27 peixes foi
291 destinado ao transporte convencional com água, em sacos plásticos com 10 L de água
292 do mar e 20 L de oxigênio puro (Berka, 1986) a 10 °C, na densidade de três peixes por
293 saco (68 g/L), além de três sacos adicionais sem peixes para avaliar as alterações dos
294 parâmetros físico-químicos da água. Em cada caixa de isopor foram colocados três
295 sacos plásticos. Outro grupo de 27 peixes foi distribuído individualmente em caixas de
296 plástico de 4 L, envoltos por uma manta umedecida com água marinha à 10 °C para o
297 transporte a seco. Os recipientes plásticos foram dispostos um ao lado do outro, sem
298 sobreposição, no fundo da caixa de isopor. A temperatura interna das caixas foi mantida
299 a 10°C, utilizando bolsas de gelo e monitorada por meio de um termômetro digital
300 (Incoterm, Brasil). A simulação do transporte durou 10 h, sendo que a cada 120 minutos
301 as caixas eram gentilmente agitadas por 10 segundos, adaptado da metodologia de
302 Colburn *et al.* (2008).

303 Os linguados transportados foram amostrados em três momentos: logo após o
304 transporte (T1), bem como 1 h (T2) e 24 h (T3) após o transporte e ao serem estocados
305 em tanques de recuperação de 40 L. Durante a recuperação os peixes foram mantidos
306 em sistema estático, com água do mar inicialmente na temperatura de 10 °C, com
307 aumento gradativo até 23 °C em função da temperatura ambiente, na densidade de três
308 peixes por tanque. Foram utilizados nove peixes por tempo de amostragem de cada
309 tratamento.

310 Após a finalização do transporte, os sacos foram abertos e o oxigênio dissolvido,
311 temperatura e pH imediatamente aferidos, uma amostra de água foi coletada para obter
312 os dados de alcalinidade, amônia total, nitrito e dióxido de carbono.

313 **3.3. Coleta de Material Biológico**

314 Os juvenis foram anestesiados com hidrocloridrato de benzocaína (50 ppm) para
315 realização das coletas de dados biométricos, com auxílio de uma balança (Marte,

316 BL3200H, Brasil 0,01 g) e ictiômetro (0,1 cm). O sangue foi coletado por meio de
317 punção caudal utilizando seringas de 3 mL heparinizadas com heparina sódica. Uma
318 alíquota foi imediatamente transferida para micro capilares para determinação do
319 hematócrito e o restante foi centrifugado em microtubos (1,5 mL) a $10.192 \times g$ durante
320 10 minutos a 4 °C (centrífuga SOLAB SL-703, Brasil). O plasma foi transferido para
321 microtubos e armazenado a -80 °C. Em seguida, os linguados foram eutanasiados em
322 banho de hidrocloreto de benzocaína (300 ppm) para coleta de músculo, fígado e
323 brânquias, que foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a
324 -80 °C.

325 **3.4. Análises Hematológicas**

326 O hematócrito foi determinado por meio da centrifugação (centrífuga Hsiang Tai
327 Machinery Industry CO., H-240, Taiwan) do sangue durante 10 min a $16.128 \times g$. A
328 glicose e o lactato foram aferidos com kits colorimétricos comerciais (Glicose
329 Enzimática Líquida, Doles, Brasil; Lactato Enzimático, Vida Biotecnologia, Brasil) com
330 leitura em espectrofotômetro a 510 nm e 546 nm, respectivamente (Biospectro, SP-22,
331 Brasil). Os íons sódio e potássio foram medidos em fotômetro de chama (Micronal,
332 B462, Brasil), e cloreto utilizando kit colorimétrico comercial (Cloretos Colorimétricos,
333 Doles, Brasil) com o protocolo adaptado para leitora de microplacas a 510 nm (Biotek,
334 Synergy HT, Winooski, VT, EUA). A osmolalidade foi mensurada com osmômetro de
335 pressão de vapor (Wercor Inc., Vapro 5600, Logan, UT, EUA).

336 **3.5. Análises Bioquímicas**

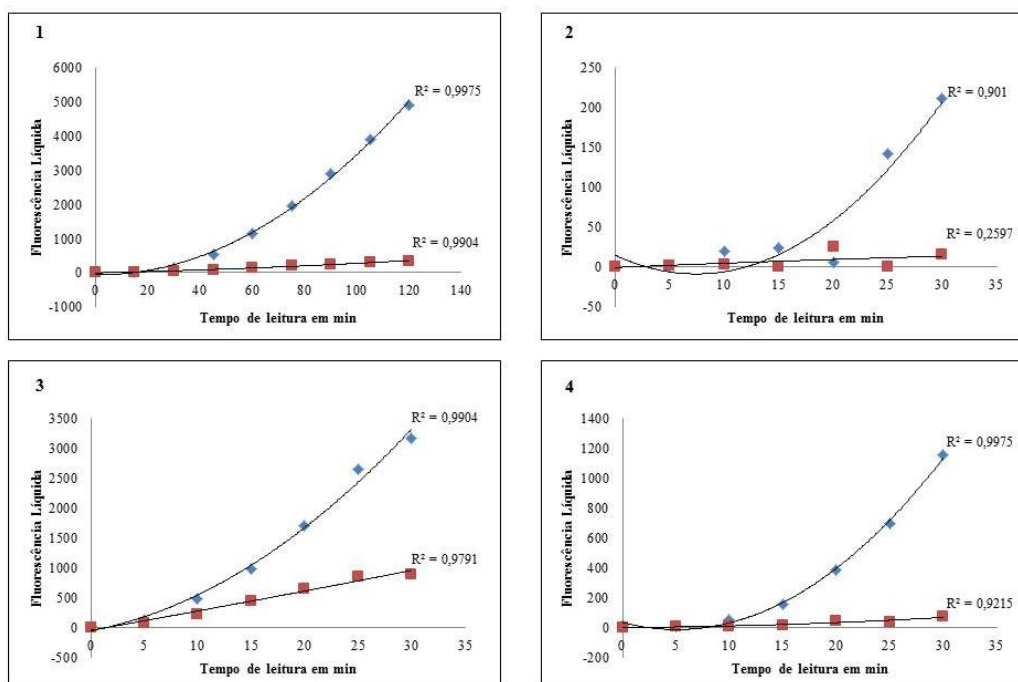
337 As amostras de brânquias, fígado e músculo foram individualmente
338 homogeneizadas (1:5-p:v) em solução tampão (20 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, 1 mM
339 ditiotreitol (Sigma Aldrich, Canadá), 500 mM sacarose, 150 mM KCl, 0,1 mM fluoreto
340 de fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma Aldrich, Alemanha), com pH ajustado em 7,6, e
341 centrifugados a $9.000 \times g$ por 30 minutos a 4 °C, como descrito por Amado *et al.*
342 (2006). O sobrenadante foi estocado a -80 °C até a realização das análises. A quantidade
343 de proteína total de cada homogeneizado foi determinada pelo método de Biureto,
344 utilizando kit colorimétrico comercial (Proteínas Totais, Doles, Brasil) por meio da
345 leitura de microplacas a 550 nm.

346 A capacidade antioxidante total frente ao radical peroxil (ACAP) foi
347 determinada pela dosagem de espécies reativas de oxigênio (ROS) como descrito por

348 Amado *et al.* (2009), utilizando homogeneizado de tecidos com 2 mg/mL de proteína
 349 total. Os radicais peroxil são formados pela termólise (37 °C) do 2,20-azobis 2-
 350 metilpropianoamidinadihidrocloro (ABAP), que na presença de 2,7 diclorofluoresceína
 351 (H₂DCF-DA) gera um fluoróforo detectado em ondas de 488 nm para excitação e 525
 352 nm para emissão. Os valores de fluorescência para as brânquias e o fígado foram
 353 quantificados a cada 5 min ao longo de 30 min, e o músculo devido a sua baixa
 354 fluorescência ao longo de 120 min a cada 15 min, em leitora de placas (Biotek, Synergy
 355 HT, Winooski, VT, EUA), como exemplificado na Figura 1. O valor da capacidade
 356 antioxidante foi obtido pelo cálculo da área relativa de com acordo com a fórmula:

$$\text{Área Relativa} = (\text{Área com ABAP} - \text{Área sem ABAP}) / (\text{Área sem ABAP})$$

357
 358 Esta técnica mede a competência do tecido em neutralizar ROS, considerando
 359 tanto as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Ou seja, a área relativa
 360 retrata a capacidade antioxidante total, no qual menores valores da área relativa indicam
 361 uma maior capacidade antioxidante.



362
 363 Figura 1- Valores de fluorescência dos tecidos com ABAP (pontos azuis) e sem ABAP
 364 (pontos vermelhos): (1) leitura do músculo ao longo de 120 min com valores de
 365 fluorescência no tecido com e sem ABAP ajustados a curva; (2) leitura do músculo ao
 366 longo de 30 min com valores de fluorescência no tecido sem ABAP mal ajustados a
 367 curva devido a baixa fluorescência; leitura das brânquias (3) e fígado (4) ao longo de 30
 368 minutos com valores de fluorescência com e sem ABAP ajustados a curva.
 369

370 O dano oxidativo lipídico foi avaliado conforme o protocolo de reação com o
371 ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrito por Oakes & Van der Kraak (2003). Esta
372 metodologia envolve a reação do malondialdeído (MDA), um produto de degradação de
373 lipídios peroxidados, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que em condições de alta
374 temperatura e acidez gera um fluoróforo que é quantificado por fluorometria (excitação:
375 515 nm e emissão: 553 nm) utilizando o 1,1,3,3-tetramethoxypropano (TMP) como
376 padrão. Utilizou-se 40, 60 e 100 µL de homogeneizado de brânquia, fígado e músculo,
377 respectivamente, que foram incubados durante 30 minutos a 95 °C com soluções de
378 hidroxitolueno butilado (BHT), ácido acético 20%, TBA 0,8% e dodecil sulfato de
379 sódio (SDS). Após estarem em temperatura ambiente, foi adicionado n-butanol, e em
380 seguida foram centrifugados a $3.000 \times g$ durante 10 minutos a 15 °C (centrífuga
381 SOLAB, SL-703, Brasil), para a separação da fase aquosa e da fase alcoólica, utilizando
382 a fase alcoólica para posterior leitura em microplacas (Biotek, Synergy HT, Winooski,
383 VT, EUA).

384 **3.6. Análise de qualidade da água**

385 As concentrações de oxigênio dissolvido (OD) e temperatura foram aferidas com
386 o oxímetro digital (YSI®, modelo 55A); a salinidade no refratômetro digital (Atago®,
387 PAL1) e o pH com pHmetro digital de bancada (Mettler 241 Toledo®, modelo FE20).
388 A alcalinidade por titulação de acordo com o método descrito por APHA (1999). As
389 análises de amônia total (TAN) de acordo com a metodologia proposta por UNESCO
390 (1983) e os valores de amônia não ionizada (NH₃-N) pelo cálculo proposto por
391 Ostrensky *et al.* (1992) adaptado de Whitfield (1974). A concentração de CO₂ foi
392 calculada pelo software Analysis Salt® (Timmons & Ebeling, 2010).

393 **3.7. Análises Estatísticas**

394 Os dados foram submetidos à análise de normalidade (Shapiro-Wilk) e
395 homocedasticidade (Levene), sendo que para os dados de glicose; TBARS do músculo;
396 ACAP das brânquias e do fígado foi aplicado transformações logarítmicas, e os dados
397 dos íons cloreto transformados em Box-Cox. Foi realizada ANOVA de duas vias, sendo
398 um fator a forma de transporte e outro fator o tempo de amostragem. Quando observada
399 diferença significativa foi aplicado o Teste de Tukey com nível de significância de 5%.
400 Para avaliar as alterações dos parâmetros físico-químicos da água nos sacos com peixe e
401 sem peixe foi realizado Teste T de Student. Os dados estão expressos em média ±

402 desvio padrão e foi utilizado o software livre de estatística R (R DEVELOPMENT
403 CORE TEAM).

404 **4. RESULTADOS**

405 Ao final do transporte e do período de recuperação, a sobrevivência foi de 100%
406 para os linguados transportados a seco ou com água.

407 A água dos sacos de transporte sem peixe (n=3) após 10 h estava a $10 \pm 0,5$ °C;
408 oxigênio dissolvido $31,19 \pm 3,0$ mg O₂/L; pH 8,17; alcalinidade 130 mg CaCO₃/L;
409 salinidade 26‰; 1 mg CO₂/L e sem níveis de amônia total e não ionizada. Foi
410 observada uma redução nos níveis de oxigênio dissolvido ($6,94 \pm 1,53$ mg O₂/L) e pH
411 ($7,3 \pm 0,09$) nos sacos com peixes (n=9) em relação ao sacos sem peixes (P < 0,05). A
412 concentração de dióxido de carbono ($7,56 \pm 1,58$ mg CO₂/L) e amônia total ($0,37 \pm 0,03$
413 mg/L) aumentou nos sacos com peixes (P < 0,05), mas sem níveis de amônia não
414 ionizada. Não foi observada alteração na temperatura ($11 \pm 0,38$ °C) e na alcalinidade
415 ($129,45 \pm 3,00$ mg CaCO₃/L) entre os sacos com e sem peixes (P > 0,05).

416 **4.1. Respostas secundárias do estresse**

417 Os valores do hematócrito e lactato (Tabela 1) não apresentaram diferenças
418 estatísticas entre os tratamentos e entre os tempos de amostragem (P > 0,05). As
419 concentrações de glicose plasmática (Tabela 1) foram mais elevadas nos juvenis
420 transportados a seco (TS) logo após o transporte (T1) em relação aos animais
421 transportados com água (TA). Após 1 h (T2) do transporte os valores de TS ainda
422 permaneciam elevados, mas ao longo de 24 h os níveis de glicose nos dois tratamentos
423 foram reduzindo, não apresentando diferenças entre si (P > 0,05).

424 Os linguados transportados em água apresentaram menores valores de
425 osmolalidade (Tabela 1) logo após o transporte e após 1 h (P < 0,05) em relação ao
426 tratamento TS. Após 24 h os valores de osmolalidade de TA e TS não apresentaram
427 diferenças significativas (P > 0,05).

428 As concentrações de Na⁺ (Tabela 1) não apresentaram diferenças entre os
429 tratamentos no mesmo tempo amostral (P > 0,05). Porém foi possível observar um
430 decréscimo dos valores de Na⁺ em TA ao longo de 24 h. Os valores plasmáticos de K⁺
431 (Tabela 1) foram estatisticamente menores (P < 0,001) no tratamento TA logo após o

432 transporte em relação ao tratamento TS. Contudo, após 24 h não apresentaram
433 diferenças entre si ($P > 0,05$).

434 Os peixes transportados a seco tiveram concentrações maiores de Cl^- (Tabela 1)
435 no T1 e T2 ($P < 0,05$) em relação ao TA. No entanto, após 24 h as concentrações não
436 foram diferentes entre os tratamentos ($P > 0,05$).

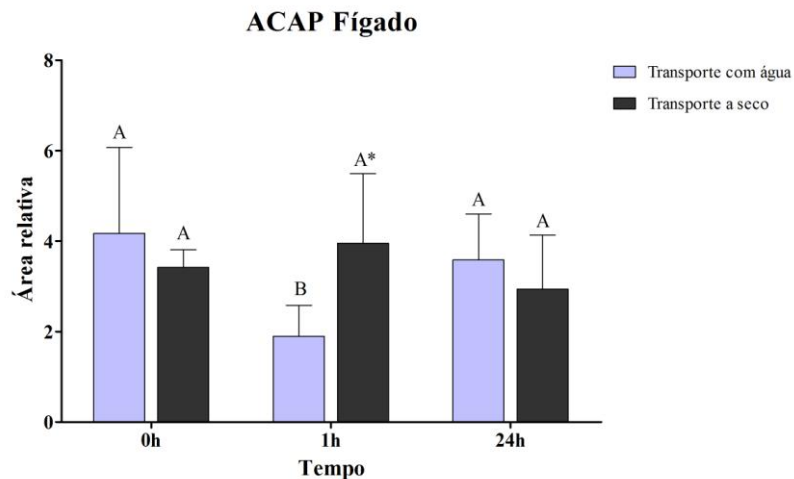
Tabela 1- Parâmetros plasmáticos e hematológicos indicadores de estresse dos juvenis de *P. orbignyanus* após serem submetidos à simulação do transporte a seco e com água nos diferentes tempos de amostragem.

| | Tratamento | Tempo | | | P valor | | |
|-------------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|---------|------------------|
| | | 0 h | 1 h | 24 h | Tratamento | Tempo | Tratamento*Tempo |
| Hematócrito (%) | TA | 21,38 ± 1,58 | 20,34 ± 2,13 | 21,88 ± 2,37 | 0,181 | 0,649 | 0,358 |
| | TS | 21,89 ± 1,70 | 22,12 ± 2,09 | 21,78 ± 1,93 | | | |
| Lactato (mmol/L) | TA | 0,08 ± 0,03 | 0,07 ± 0,02 | 0,08 ± 0,04 | 0,583 | 0,295 | 0,789 |
| | TS | 0,09 ± 0,05 | 0,08 ± 0,03 | 0,08 ± 0,02 | | | |
| Glicose (mg/dL) | TA | 46,09 ± 18,21 ^{A*} | 55,74 ± 27,64 ^A | 21,95 ± 10,04 ^B | 0,037 | < 0,001 | 0,007 |
| | TS | 89,60 ± 18,96 ^A | 70,67 ± 35,09 ^A | 17,94 ± 8,03 ^B | | | |
| Osmolalidade (mOsm/kg) | TA | 339 ± 41,86 * | 329 ± 17,89 * | 368,12 ± 57,90 | 0,001 | 0,768 | 0,018 |
| | TS | 393,12 ± 33,41 | 384 ± 43,98 | 355,89 ± 43,58 | | | |
| Na⁺ (mEq/L) | TA | 238,70 ± 26,48 ^A | 198,36 ± 23,24 ^B | 189,45 ± 31,60 ^B | 0,159 | 0,002 | 0,181 |
| | TS | 229,40 ± 31,66 | 217,99 ± 34,97 | 211,77 ± 15,33 | | | |
| K⁺ (mEq/L) | TA | 2,91 ± 0,61 ^{A*} | 2,95 ± 0,60 ^A | 4,65 ± 1,22 ^B | 0,036 | 0,018 | < 0,001 |
| | TS | 4,20 ± 0,84 | 3,99 ± 0,82 | 3,74 ± 0,60 | | | |
| Cl⁻ (mEq/L) | TA | 119,27 ± 5,87 ^{A*} | 130,81 ± 7,85 ^{B*} | 131,78 ± 4,16 ^B | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| | TS | 154,30 ± 13,96 ^A | 159,19 ± 7,09 ^A | 135,19 ± 11,11 ^B | | | |

Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ao longo do tempo em cada tratamento, e asteriscos (*) indicam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo amostral. Ambos determinados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio padrão (n=9). TS: transporte a seco. TA: transporte com água. 0 h: logo após o transporte; 1 h e 24 h após o transporte em recuperação.

435 4.2. Capacidade antioxidante total contra radical peroxil (ACAP)

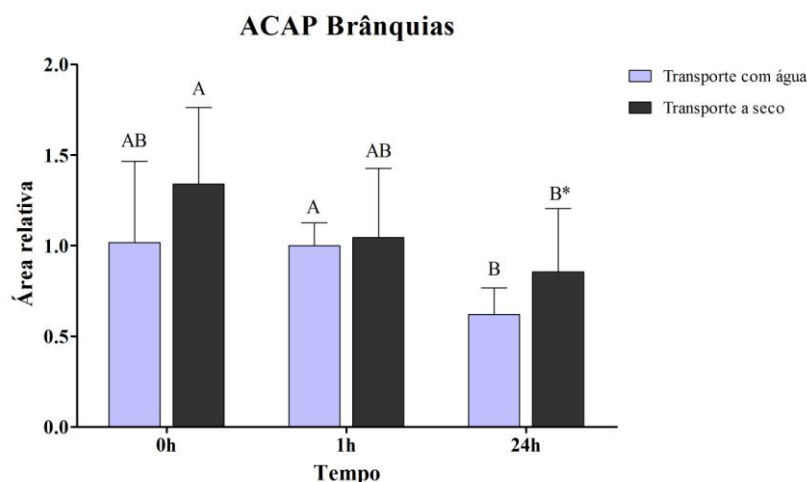
436 A capacidade antioxidante total contra radical peroxil no fígado dos juvenis
437 transportados com água foi significativamente maior após 1 h em relação aos animais
438 transportados a seco no mesmo tempo e aos demais peixes transportados em água nos
439 diferentes tempos amostrais ($P < 0,05$) (Figura 2). Porém, não houve diferença na
440 competência antioxidante do fígado nos juvenis após o transporte e depois de 24 h entre
441 os tratamentos ($P > 0,05$).



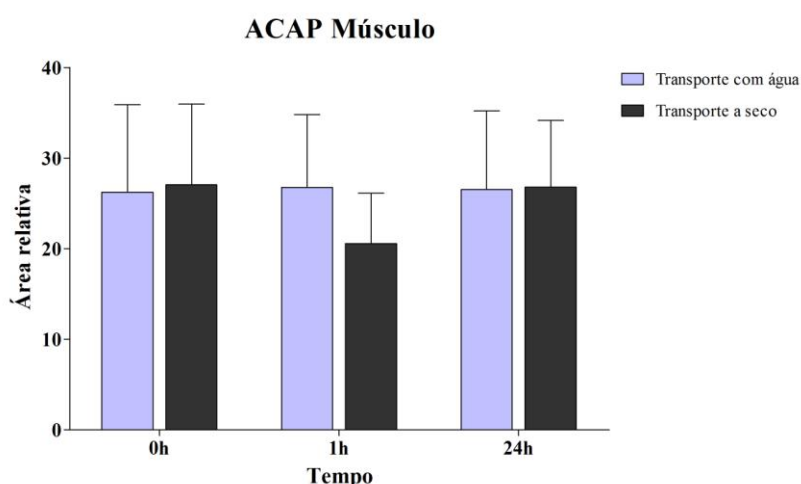
442
443 Figura 2- Capacidade antioxidante total contra radical peroxil no fígado de *Paralichthys*
444 *orbignyanus* nos diferentes tempos amostrais: 0 h, 1 h e 24 h após o transporte.
445 Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ao longo do tempo em
446 cada tratamento, asteriscos (*) indicam diferenças entre os tratamentos no mesmo
447 amostral. Ambos determinados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.
448 Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=9).

449
450 Nas brânquias não se observou diferenças na capacidade antioxidante entre os
451 tratamentos logo após o transporte e depois de 1 h ($P > 0,05$). Todavia, ao longo de 24 h
452 a competência antioxidante foi aumentando em ambos os tratamentos (Figura 3),
453 apresentando diferenças significativas entre os tratamentos depois de 24 h ($P < 0,05$).

454 O transporte a seco e com água não alterou a competência antioxidante do
455 músculo dos juvenis (Figura 4). Nos dois tratamentos as concentrações não tiveram
456 diferenças entre si e nem ao longo do tempo ($P > 0,05$).



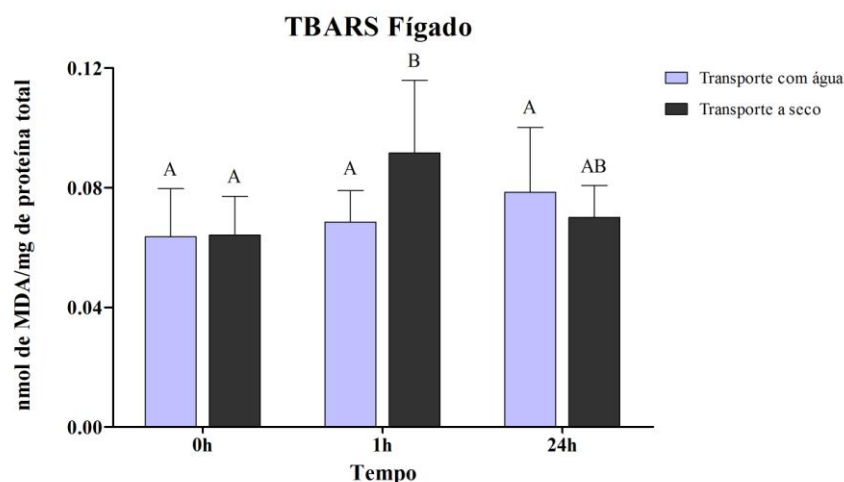
457
 458 Figura 3- Capacidade antioxidante total contra radical peroxil nas brânquias de
 459 *Paralichthys orbignyanus* nos diferentes tempos amostrais: 0 h, 1 h e 24 h após o
 460 transporte. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ao longo do
 461 tempo em cada tratamento, asteriscos (*) indicam diferenças entre os tratamentos no
 462 mesmo tempo amostral. Ambos determinados por ANOVA de duas vias seguido do
 463 teste de Tukey. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=9).
 464



465
 466 Figura 4- Capacidade antioxidante total contra radical peroxil no músculo de
 467 *Paralichthys orbignyanus* nos diferentes tempos amostrais: 0 h, 1 h e 24 h após o
 468 transporte.

469 **4.3. Lipoperoxidação lipídica (TBARS)**

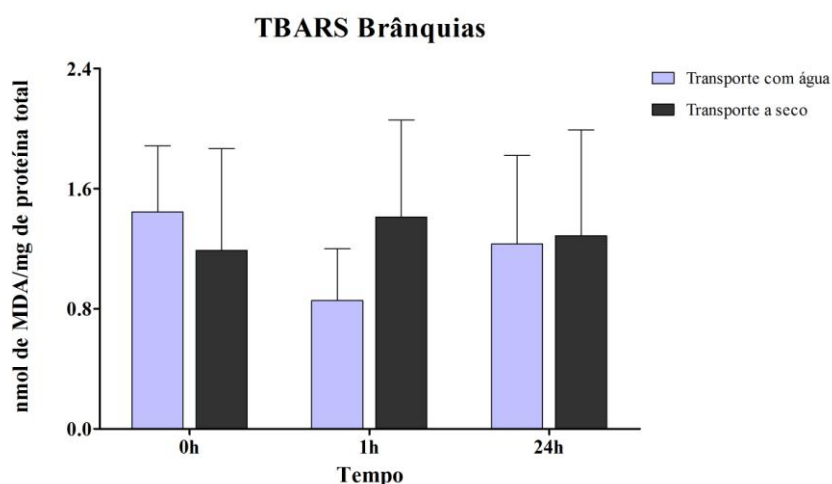
471 O indicador bioquímico de dano oxidativo não apresentou diferenças
 472 significativas para o fígado (Figura 5) e brânquias (Figura 6) entre os tratamentos e nos
 473 diferentes tempos amostrais ($P > 0,05$). No entanto, foi observada uma elevação nos
 474 valores de TBARS no fígado no tratamento a seco após 1 h em relação ao mesmo
 475 tratamento logo após o transporte ($P < 0,05$).



476

477 Figura 5- Concentração de MDA no fígado de *Paralichthys orbignyanus* nos diferentes
 478 tempos amostrais: 0 h, 1 h e 24 h após o transporte. Diferentes letras maiúsculas
 479 indicam diferenças significativas ao longo do tempo em cada tratamento, asteriscos (*)
 480 indicam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo amostral. Ambos
 481 determinados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. Dados expressos em
 482 média ± desvio padrão (n=9).

483

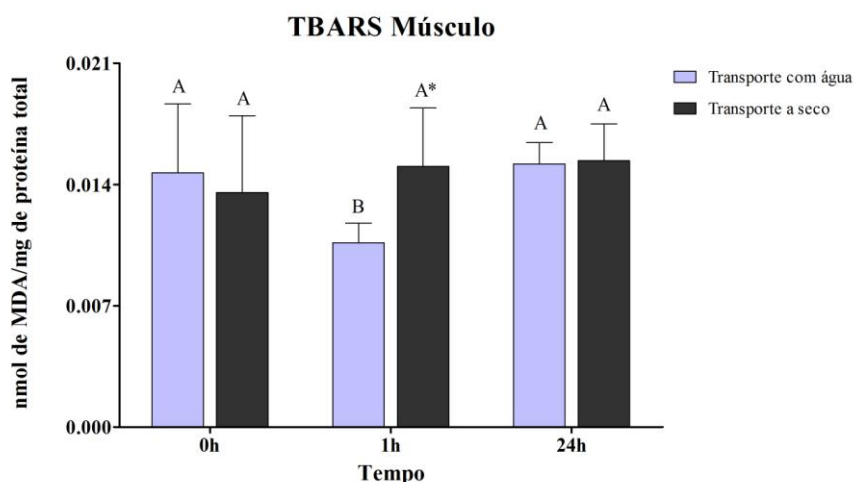


484

485 Figura 6- Concentração de MDA nas brânquias de *Paralichthys orbignyanus* nos
 486 diferentes tempos amostrais: 0 h, 1 h e 24 h após o transporte. Dados expressos em
 487 média ± desvio padrão (n=9).

488

489 No entanto, os juvenis transportados com água apresentaram menor dano
 490 lipídico no músculo (Figura 7) após 1 h ($P < 0,05$) em relação aos demais tempos
 491 amostrais e ao tratamento a seco no mesmo tempo.



492

493 Figura 7- Concentração de MDA no músculo de *Paralichthys orbignyanus* nos
 494 diferentes tempos amostrais: 0 h, 1 h e 24 h após o transporte. Diferentes letras
 495 maiúsculas indicam diferenças significativas ao longo do tempo em cada tratamento,
 496 asteriscos (*) indicam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo amostral.
 497 Ambos determinados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. Dados
 498 expressos em média \pm desvio padrão (n=9).

499

500 5. DISCUSSÃO

501 As mudanças nos parâmetros de qualidade da água durante o transporte são os
 502 maiores responsáveis pela mortalidade dos peixes (Berka, 1986; Lim *et al.*, 2003;
 503 Sampaio & Freire, 2016). Dependendo da espécie e das condições de transporte, o
 504 metabolismo do peixe pode chegar a aumentar até três vezes, o que resulta em maior
 505 consumo de oxigênio e excreção de CO₂ na água (Lim *et al.*, 2003). Os altos níveis de
 506 CO₂ acidificam a água, reduzindo o pH e elevando o CO₂ plasmático, afetando o
 507 equilíbrio ácido – básico sanguíneo do peixe e a capacidade de transporte de oxigênio
 508 no sangue, devido a menor afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Efeito Bohr)
 509 (Ishimatsu *et al.*, 2004; Treasurer, 2012).

510 As concentrações de CO₂ observadas no presente estudo estavam dentro da faixa
 511 encontrada em sistemas de produção de peixes marinhos (Treasurer, 2012). Os demais
 512 parâmetros de qualidade de água estavam dentro das faixas de tolerância descrita para
 513 *P. orbignyanus*, que tem capacidade de tolerar ampla faixa de temperatura (Wasielesky
 514 *et al.*, 1998), salinidade (Sampaio & Bianchini, 2002), baixos valores de pH
 515 (Wasielesky *et al.*, 1997) e concentrações elevadas de compostos nitrogenados
 516 (Bianchini *et al.*, 1996).

517 As respostas ao estresse variam conforme a espécie, sua magnitude e duração
 518 (Wendelaar Bonga, 1997). A forma de transporte avaliada neste trabalho, além dos

519 fatores estressantes intrínsecos a essa atividade, submeteu os juvenis a um processo de
520 redução da temperatura e exposição a um ambiente com menor capacidade de obtenção
521 do oxigênio, como no caso do transporte a seco. Diante desta serie de eventos, os
522 juvenis de linguado tiveram respostas fisiológicas diferentes entre as formas de
523 transporte.

524 A glicose é um parâmetro utilizado para avaliar respostas secundárias ao estresse
525 em peixes (Wedemeyer, 1997; Barton, 2002; Sampaio & Freire, 2016). Os juvenis
526 transportados a seco apresentaram um pico de glicose logo após o transporte, indicando
527 um estresse mais acentuado nessa forma de transporte. Os altos valores de glicose
528 plasmática indicam uma resposta secundária ao estresse proveniente da elevação das
529 catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) e do cortisol (Barton & Iwama, 1991; Barton,
530 2002).

531 A adrenalina é o hormônio sinalizador responsável pela mobilização de energia
532 para o animal durante o estresse, ela estimula a quebra do glicogênio (glicogenólise) no
533 fígado, elevando as concentrações de glicose no sangue, que serve de substrato energético
534 para a manutenção do organismo diante das adversidades ocasionadas pelo estresse
535 (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

536 Benovit *et al.* (2012) ao transportarem o linguado *P. orbignyanus* durante 7 h
537 não observaram alterações nos níveis plasmáticos de glicose, inferindo que o transporte
538 em si não causou alteração neste parâmetro. Os animais transportados em água no
539 presente trabalho também não tiveram elevações na glicose devido ao transporte.
540 Entretanto, Bolasina (2011) observou níveis elevados de cortisol em *P. orbignyanus*
541 após 1 h de transporte, inferindo que esta elevação foi uma resposta primária ao
542 estresse. No entanto, elevados níveis de glicose plasmática após o transporte com água
543 já foram reportados para o *Gadus morhua* (Staurnes *et al.*, 1994), *Salmo salar* (Iversen
544 *et al.*, 1998) *Paralichthys olivaceus* (Hur *et al.*, 2007), *Perca fluviatilis* (Acerete *et al.*,
545 2004), *Labeo rohita* (Pakhira *et al.*, 2015).

546 Apesar do aumento da glicose no transporte a seco, indicando que nessa forma
547 de transporte houve uma maior necessidade de mobilização de energia para manutenção
548 das atividades metabólicas, foi possível observar que os níveis de glicose plasmática em
549 ambas os transportes diminuíram, tendo o mesmo efeito independente da forma de
550 transporte após 24 h.

551 O lactato plasmático também é um parâmetro secundário do estresse. Apesar dos
552 baixos valores encontrados neste trabalho para o *P. orbignyanus*, eles foram

553 semelhantes aos reportado para o “turbot” *Scophthalmus maximus* quando mantidos em
554 diferentes concentrações de OD na água (7,2; 5,0; 3,5 mg O₂/L) (Pichavant *et al.*, 2000).
555 Independente disso era esperado um aumento do lactato nos animais no transporte a
556 seco, tendo em vista que eles foram expostos a um ambiente com menor capacidade de
557 obtenção de oxigênio, o que poderia ativar o metabolismo anaeróbico, e
558 consequentemente a formação de lactato após a exposição ao ar, como observado em
559 *Sparus aurata* (Arends *et al.*, 1999), *Paralichthys olivaceus* (Hur *et al.*, 2007) e
560 *Rachycentron canadum* (Trushenski *et al.*, 2010).

561 Quando o animal é exposto a níveis reduzidos de oxigênio e sua concentração é
562 insuficiente para a sua manutenção, dois mecanismos metabólicos podem ser adotados:
563 produção de ATP de forma anaeróbica, utilizando como substrato o glicogênio e tendo
564 como produto final o lactato; ou a redução da demanda de ATP, com a diminuição do
565 metabolismo abaixo da sua taxa metabólica padrão (Dalla Via *et al.*, 1998). Como
566 exemplo temos o linguado comum *Solea solea*, que ao ser exposto a níveis menores de
567 oxigênio reduziu seu metabolismo (Dalla Via *et al.*, 1997), mas quando exposto a uma
568 hipóxia severa apresentou um aumento no metabolismo anaeróbico, seguido novamente
569 de uma redução nas taxas metabólicas (Dalla Via *et al.*, 1998). Apesar da ativação do
570 metabolismo anaeróbico, foi verificada que a depressão metabólica foi uma estratégia
571 mais eficiente do que a indução do metabolismo anaeróbico nessa espécie (Dalla Via *et*
572 *al.*, 1998).

573 No entanto, nas duas formas de transporte as concentrações de lactato
574 plásmatico foram baixas. Vale ressaltar que os juvenis de *P. orbignyanus* foram
575 submetidos ao um processo de redução da temperatura da água, a fim de diminuir seu
576 metabolismo, para minimizar as possíveis alterações fisiológicas ocasionadas pelo
577 estresse durante o transporte, principalmente nos animais transportados a seco.

578 A redução da temperatura da água para diminuir o metabolismo, e
579 consequentemente minimizar as respostas fisiológicas ao estresse é um método antigo
580 utilizado no transporte de peixes (Wedemeyer, 1997; Skjervold *et al.*, 2001).

581 A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no músculo do *Gillichthys*
582 *mirabilis* foi inibida em até 50% quando a temperatura da água foi reduzida para 10 °C
583 (Somero, 1973). Os níveis de lactato plasmático em *Oreochromis niloticus* (Sun *et al.*,
584 1992; 1995) e *Cyprinus carpio* (Tanck *et al.*, 2000) diminuíram após os peixes serem
585 submetidos a reduções de temperatura. O conteúdo de lactato no músculo do linguado
586 japonês *Paralichthys olivaceus* foi menor em baixas temperaturas (2 e 4 °C) do que em

587 temperaturas mais elevadas (6, 8, 10, 12, e 20 °C) quando submetidos à quatro semanas
588 de restrição alimentar (Shim *et al.*, 2012). Sendo assim, pode ser sugerido que o
589 decréscimo da temperatura da água antes e durante o transporte reduziu a atividade da
590 enzima LDH do *P. orbignyana*, resultando em concentrações baixas de lactato
591 plásmatico logo após o transporte. No entanto, mesmo quando a temperatura da água
592 volta a 23 °C durante as 24 h de recuperação, os valores de lactato ainda continuaram
593 baixos. Isto pode estar relacionado ao fato do animal estar em jejum (Deng *et al.*, 2004),
594 e confinado em um ambiente pequeno, o que por si só já mantém um metabolismo
595 baixo.

596 O desequilíbrio hidromineral também pode ser alterado pelo estresse. A maior
597 exigência metabólica eleva o consumo de oxigênio e a pressão sanguínea, que
598 consequentemente deixa as membranas branquiais mais permeáveis. Desta forma, causa
599 saída de água e entrada de íons em peixes marinhos, e ganho de água e perda de íons em
600 peixes de água doce (Wendelaar Bonga, 1997, 2011). Contraditoriamente, os resultados
601 deste trabalho não mostraram elevações nos valores hidrominerais nestas condições de
602 transporte. No entanto, foi observado que os juvenis transportados com água,
603 apresentaram menores valores iônicos de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ e de osmolalidade,
604 principalmente logo após o transporte, uma resposta atípica para peixes marinhos em
605 situação de estresse. Contudo, no transporte a seco pode não ter ocorrido trocas iônicas
606 dos peixes com o meio, o que consequentemente não alterou as concentrações
607 plasmáticas dos íons e da osmorregulação ao fim do transporte.

608 A osmolalidade da *Perca fluviatilis*, espécie de água doce, diminuiu após ser
609 transportada por 4h (Acerete *et al.*, 2004). O salmão *Salmo salar* que na fase de smolt
610 habita água doce, reduziu suas concentrações plasmáticas de cloreto após o transporte,
611 no entanto, ao avaliarem a osmolaridade e os íons de cloreto em outro trabalho,
612 verificaram o aumento plasmático destes parâmetros ao final do transporte (Iversen *et*
613 *al.*, 1998, 2005). Enquanto, Boerrigter *et al.* (2015) relataram que a osmolaridade e íons
614 cloreto da espécie eurialina *Anguilla anguilla*, não alteraram devido ao transporte. O
615 peixe marinho *Chanos chanos* após ser transportado por 20 h reduziu os íons Cl⁻ e
616 aumentou as concentrações dos íons Na⁺ e K⁺ ao final do transporte (Paterson *et al.*,
617 2003). Já o *P. olivaceus* aumentou sua osmolalidade após o transporte (Hur *et al.*,
618 2007).

619 Visto que cada espécie de peixe responde de forma diferente ao balanço
620 hidromineral frente ao transporte, outro fator que pode ter influenciado nas alterações

621 das concentrações iônicas plasmáticas no presente trabalho podem estar relacionadas à
622 diminuição da temperatura. O “turbot” *S. maximus* teve as concentrações do íon K^+
623 reduzidas quando submetido a uma temperatura menor, mas não houve alterações da
624 osmolalidade, Na^+ e Cl^- (Burel *et al.*, 1996). Enquanto o esturjão *Acipenser naccarii*,
625 quando aclimatado de 25 a 17 °C apresentou redução nos valores iônicos de Cl^- (Cataldi
626 *et al.*, 1998). Diferentemente do esturjão, o "sunshine bass", híbrido de *Morone*
627 *chrysops* e *Morone saxatilis*, teve sua concentração plasmática de Cl^- mais elevada em
628 menores temperaturas (Davis, 2004). Enquanto, espécimes de *Atractoscion nobilis*
629 reduziram sua osmolalidade frente a uma diminuição da temperatura da água de 18 °C
630 para 13,5 °C (Rombenso *et al.*, 2015).

631 As concentrações iônicas de Na^+ dos linguados seguiram a mesma tendência em
632 ambas às formas de transporte, ou seja, uma progressiva diminuição nas concentrações
633 plasmáticas. Em peixes marinhos ocorre a perda de água via osmose e influxo de íons
634 ao longo do tegumento, e em particular sobre o epitélio branquial, que é compensada
635 pela absorção de água do mar pelo intestino, e eliminação de quantidades de Na^+ e Cl^-
636 pelas células de cloreto, além da excreção de íons bivalentes pelos rins e intestinos
637 (Wendelaar Bonga, 1997). A excreção de Na^+ é um processo normal na osmorregulação
638 dos peixes, e parece ter sido pouco alterado pela forma de transporte em comparação
639 aos outros íons.

640 No entanto, os juvenis de *P. orbignyanus* não apresentaram diferenças para a
641 osmolalidade e os íons após 24 h entre as duas formas de transporte. As concentrações
642 iônicas e a osmolalidade de *P. orbignyanus* após 24 h do transporte foram semelhantes
643 aquelas observadas por Sampaio & Bianchini (2002) em linguados criados em água
644 doce por 90 dias, que foram menores do que a dos linguados criados em água salgada.
645 O menor crescimento dos linguados em água doce pode caracterizar essa redução da
646 concentração de íons e osmolalidade como uma situação estressante.

647 Diante das alterações plasmáticas observados nos juvenis, pode-se inferir que os
648 valores de hematócrito não foram influenciados pela forma de transporte, visto que não
649 houve diferenças entre os tratamentos em nenhum tempo amostral.

650 A tolerância ao estresse também está relacionada a condições determinadas
651 geneticamente, fazendo com que algumas espécies sejam mais resistentes do que outras
652 (Wedemeyer, 1997). O linguado *P. orbignyanus* é um peixe bentônico de hábito
653 sedentário (Figueiredo & Menezes, 2000), caracterizado como um peixe
654 marinho/estuarino eurialino capaz de tolerar diversas mudanças ambientais (Sampaio &

655 Bianchini, 2002). Estas características naturais da espécie podem explicar o fato de o
656 linguado ter tolerado bem as adversidades expostas durante o transporte.

657 A formação de espécies reativas de oxigênio é inevitável em organismos
658 aeróbicos (Halliwell & Whiteman, 2004). Em situações onde não há estresse, a
659 formação e remoção de ROS são balanceadas no organismo (Zhang *et al.*, 2016).

660 As mudanças na concentração de O₂ no ambiente alteram a produção de ROS,
661 podendo gerar estresse oxidativo, tanto em hiperóxia como em hipóxia (Lushchak,
662 2011). Os efeitos de anóxia/ hipóxia e reoxigenação sobre o balanço redox e
663 mecanismos de adaptações nos organismos aquáticos também são bem conhecidas
664 (Lushchak *et al.*, 2001, 2005; Hermes-Lima *et al.*, 2015; Ransberry *et al.*, 2016; Zhang
665 *et al.*, 2016). A reoxigenação eleva a produção de ROS, e caso o sistema de defesas
666 antioxidante do organismo não seja eficiente para remover o excesso de ROS, poderá
667 gerar danos (Halliwell & Whiteman, 2004).

668 Em algumas espécies de peixes foi observado aumento das atividades
669 antioxidantes quando os animais foram expostos a hipóxia (Lushchak *et al.*, 2001, 2005;
670 Zhang *et al.*, 2016), o que é considerado uma preparação dos peixes para enfrentar a
671 formação em excesso de ROS quando reoxigenados, e conseqüentemente evitar um
672 possível estresse oxidativo (Hermes-Lima *et al.*, 2015). No entanto, nem todos os
673 animais respondem à restrição de oxigênio elevando os níveis de antioxidantes
674 (Hermes-Lima *et al.*, 2015), pois, as respostas ao ambiente com pouco oxigênio variam
675 conforme as espécies de peixes e o grau de hipóxia (Xiao, 2015; Zhang *et al.*, 2016).
676 Contudo, é importante salientar que as respostas ao estresse oxidativo são tecido e
677 espécie específicas (Vinagre *et al.*, 2012; Madeira *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

678 Os valores de TBARS no fígado não apresentaram diferenças entre os
679 tratamentos no mesmo tempo amostral. O *Carassius auratus* ao ser submetido à hipóxia
680 e reoxigenação aumentou as atividades da catalase e GR, e manteve níveis altos de
681 outros antioxidantes (SOD, GPx, GST, G6PDH, e GSH) no fígado após 14 h de
682 recuperação, no entanto, o aumento das enzimas antioxidantes não foi suficiente para
683 evitar dano lipídico neste tecido (Lushchak *et al.*, 2001). Espécimes de *Acanthopagrus*
684 *schlegeli* ao serem submetidos a estresse termal e salino, apresentaram maior expressão
685 genica de Cu/Zn-superoxido dismutase (Cu/Zn-SOD), catalase, glutathiona peroxidase
686 (GPx) no fígado, conseqüentemente as concentrações dessas enzimas também
687 aumentaram, além de observado maiores valores de malondialdeído (MDA), um
688 subproduto da oxidação lipídica (An *et al.*, 2010). Já o linguado *Solea senegalensis* ao

689 ser submetido ao estresse termal (12-18 °C e 18-12 °C) não apresentou danos lipídicos
690 no fígado e nem aumento das enzimas antioxidantes (Castro *et al.*, 2012).

691 A brânquia é um dos órgãos mais susceptíveis a formação de ROS, obviamente
692 por estar em constante contato com o ambiente (Wu *et al.*, 2015). Mesmo com as
693 alterações na ACAP na brânquia, o linguado também foi capaz de manter seu balanço
694 redox diante das adversidades do transporte para este tecido, visto que não houve
695 diferenças nas concentrações de TBARS. O “turbot” *Scophthalmus maximus* ao ser
696 submetido a diferentes concentrações de nitrito, apresentou menores valores das
697 enzimas GPx, SOD, CAT, nas concentrações onde níveis de MDA, eram mais elevados
698 (Jia *et al.*, 2015). Os juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* ao serem transportados em
699 situação de hiperóxia e hipóxia, com a adição do óleo essencial de *Lippia alba* na água,
700 apresentaram menor lipoperoxidação lipídica nas brânquias, tanto em hiperóxia como
701 em hipóxia em comparação aos juvenis transportados sem o anestésico (Azambuja *et*
702 *al.*, 2011).

703 Em relação ao músculo, a capacidade antioxidante também não teve alterações,
704 no entanto, foi possível verificar uma diminuição pontual dos valores de TBARS nos
705 animais transportados em água 1 h após o transporte, sendo inferior tanto em relação ao
706 outro tratamento como os animais na mesma forma de transporte logo após o transporte
707 e em 24 h.

708 A oxidação lipídica é uma das respostas mais relevantes do dano celular. Ocorre
709 quando os ROS, principalmente o $\cdot\text{OH}$ atua nos ácidos poli-insaturados, gerando uma
710 reação em cadeia e uma severa injúria, resultando em disfunção e perda na integridade
711 da membrana celular (Halliwell & Whiteman, 2004).

712 Os animais transportados a seco não apresentaram danos lipídicos nos tecidos
713 analisados, tendo em vista que não houve diferenças entre os tratamentos no mesmo
714 tempo, principalmente após a reoxigenação, no caso do transporte a seco, pois sabe-se
715 que o aumento nos níveis de O_2 elevam a produção de ROS, e se o sistema de defesa
716 antioxidante não for capaz de remove-lo, pode gerar dano. Vale ressaltar que apesar das
717 alterações pontuais na capacidade antioxidante no fígado e nas brânquias, as formas de
718 transporte não causaram dano lipídico. Além disso, as alterações na competência
719 antioxidante podem estar relacionadas ao ritmo circadiano, que devido às variações no
720 consumo de oxigênio dos animais ao decorrer do dia podem levar a alterações no estado
721 redox, independente do tratamento submetido, como observado no caranguejo
722 *Chasmagnathus granulata* (Maciel *et al.*, 2004).

723 Ao longo dos anos novas técnicas de transporte foram adotadas para minimizar o
724 estresse durante o transporte: como manter os animais em jejum, utilizar sal, anestésicos
725 e tampões na água, bem como reduzir a temperatura da água para o transporte (Lim *et*
726 *al.*, 2003; Harmon, 2009; Sampaio & Freire, 2016). Esses procedimentos buscam
727 minimizar o efeito do estresse ocasionado pelo transporte para minimizar as taxas de
728 mortalidade durante e após o transporte (Lim *et al.*, 2003), de maneira que seja possível
729 aumentar a densidade de transporte em um menor volume de água, principalmente
730 quando o transporte é realizado por avião. A mortalidade de peixes decorrente do
731 transporte significa perda econômica, e a aquicultura como qualquer atividade produtiva
732 busca medidas para evitar tais perdas.

733 O custo do transporte também é um atrativo para aperfeiçoar as técnicas de
734 transporte a seco. O transporte de carga viva oferecido pelas companhias aéreas
735 nacionais chega a custar R\$ 35/kg. O peso do saco de transporte com água e três
736 animais é de aproximadamente 10,7 kg (10 kg o saco com água + o peso dos juvenis), e
737 no transporte a seco o peso é aproximadamente 2,2 kg (três recipientes, cada um 0,5 kg,
738 mais o peso dos juvenis). Sendo assim, ao incluir o peso da caixa de isopor mais a
739 quantidade de gelo utilizado para manter a temperatura durante o transporte (2,4 kg cada
740 caixa de isopor + 2 kg referente ao gelo utilizado em cada caixa) o valor do transporte
741 com a água seria de R\$ 1277,5 equivalente a uma caixa de isopor com três sacos de
742 transporte, o que totaliza um valor de R\$ 3832,5 (três caixas de isopor com 27 peixes no
743 total), enquanto, o transporte a seco custaria R\$ 332,85 para uma caixa de isopor com
744 sete recipientes plásticos mais os peixes, resultando num total de R\$ 1229,55 (três
745 caixas de isopor com 21 peixes + uma caixa de isopor com três peixes). Levando em
746 consideração a metodologia aplicada em ambas às formas de transporte neste trabalho, o
747 transporte a seco pode reduzir o custo em até aproximadamente três vezes.

748 Ambas as formas de transporte propostas neste trabalho se mostraram muito
749 eficiente para o *P. orbignyana*, visto que não houve mortalidade durante o transporte e
750 após 24 h. A densidade de estocagem utilizada nesse trabalho para o transporte com
751 água (68 g/L) foi mais elevada que a relatada em outros trabalhos para linguado.
752 Benovit *et al.* (2012) ao transportar juvenis de *P. orbignyana*, durante 7 h, na
753 densidade de 35 g/L a 20 °C, em sistema fechado, não observou mortalidades referente
754 ao transporte, mas quando o transporte foi realizado em conjunto com óleo essencial de
755 *Aloysia gratíssima* nas concentrações de 135 mg/L e 90 mg/L, obteve uma mortalidade

756 de 100% e 83%, respectivamente. Já Bolasina (2011) ao transportar *P. orbignyanus*
757 durante 1 h, na densidade de 1,71 g/L em container de 20 L a 20 °C, também não
758 observou mortalidade decorrente do transporte.

759 **6. CONCLUSÃO**

760 O processo de redução da temperatura da água se mostrou efetivo para
761 minimizar o efeito do estresse ocasionado pelo processo envolvido no transporte
762 (manuseio, confinamento) tanto a seco como em água. Em adição, o linguado *P.*
763 *orbignyanus* mostrou ser uma espécie resistente e com mecanismo bioquímico muito
764 eficiente, visto que os processos adotados para a simulação do transporte não causaram
765 mortalidade e não induziram estresse oxidativo aos peixes. Dessa maneira, é possível
766 inferir que o linguado pode ser transportado a seco pelo período de até 10 h a 10 °C,
767 tendo em vista que ambas as formas de transporte causam o mesmo efeito nos peixes
768 após 24 h. Além disso, o transporte a seco pode representar uma economia de até três
769 vezes no valor do transporte.

770

771 **7. REFERÊNCIAS**

- 772 ACERETE, L, JC BALASCH, E ESPINOSA, A JOSA & L TORT. 2004. Physiological
773 responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport
774 and handling. *Aquaculture*, 237(1): 167-178.
- 775 AMADO, LL, RB ROBALDO, L GERACITANO, JM MONSERRAT & A
776 BIANCHINI. 2006. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder
777 *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon
778 estuary (Southern Brazil). *Mar. Pollut. Bull.*, 52(2): 207-213.
- 779 AMADO, LL, ML GARCIA, PB RAMOS, RF FREITAS, B ZAFALON, JLR
780 FERREIRA, JS YUNES & JM MONSERRAT. 2009. A method to measure total
781 antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to
782 evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.*, 407: 2115–212.
- 783 AN, KM, NN KIM, HS SHIN, GS KIL & CY CHOI. 2010. Profiles of antioxidant gene
784 expression and physiological changes by thermal and hypoosmotic stresses in black
785 porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). *Comp. Biochem. Phys. A.*, 156(2): 262-268.
- 786 APHA (American Public Health Association). 1999. Standard methods for the
787 examination of water and wastewater. 20nd edn. 541 pp. American Public Health

788 Association/ American Water Works Association/ Water Environment Federation,
789 Washington DC.

790 ARENDS, RJ, JM MANCERA, JL MUÑOZ, SE WENDELAAR BONGA & G FLIK.
791 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air
792 exposure and confinement. *J. Endocrinol.*, 163(1): 149-157.

793 AZAMBUJA, CR, J MATTIAZZI, APK RIFFEL, IA FINAMOR, LO GARCIA, CG
794 HELDWEIN, BM HEINZMANN, B BALDISSEROTTO, MA PAVANATO & SF
795 LLESUY. 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress
796 parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to
797 transport. *Aquaculture*, 319(1):156-161.

798 BARTON, BA & GK IWAMA. 1991. Physiological changes in fish from stress in
799 aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu.*
800 *Rev. Fish. Dis.*, 1: 3-26.

801 BARTON, BA. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference
802 to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, 42(3): 517-525.

803 BENOVIĆ, SC, LT GRESSLER, LL SILVA, LO GARCIA, MH OKAMOTO, JS
804 PEDRON, LA SAMPAIO, RV RODRIGUES & B BALDISSEROTTO. 2012.
805 Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with
806 essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *J. World Aquacult.*
807 *Soc.*, 43(6): 896-900.

808 BERKA, R. 1986. The transport of live fish: a review. Food and Agriculture
809 Organization of the United Nations. N° 48.

810 BIANCHINI, A, W WASIELESKY & KC MIRANDA FILHO. 1996. Toxicity of
811 nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *B.*
812 *Environ. Contam. Tox.*, 56: 453-459.

813 BLIER, P. 2014. Fish health: an oxidative stress perspective. *Fish. Aquac. J.*, 5: e105.

814 BOERRIGTER, JG, R MANUEL, R BOS, JA ROQUES, T SPANINGS, G FLIK &
815 HW VIS. 2015. Recovery from transportation by road of farmed European eel
816 (*Anguilla anguilla*). *Aquacult. Res.*, 46(5): 1248-1260.

817 BOLASINA, SN. 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*,
818 Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. *Aquaculture*, 313(1): 140-143.

819 BOLEZA, KA, LE BURNETT & KG BURNETT. 2001. Hypercapnic hypoxia
820 compromises bactericidal activity of fish anterior kidney cells against opportunistic
821 environmental pathogens. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 593-610.

- 822 BUREL, C, PL RUYET, F GAUMET, A LE ROUX, A SÉVERÈ & G BOEUF. 1996.
823 Effects of temperature on growth and metabolism in juvenile turbot. *J. Fish*
824 *Biol.*, 49(4): 678-692.
- 825 CASTRO, C, A PÉREZ-JIMÉNEZ, I GUERREIRO, H PERES, M CASTRO-CUNHA
826 & A OLIVA-TELES. 2012. Effects of temperature and dietary protein level on
827 hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp.*
828 *Biochem. Phys. A*, 163(3): 372-378.
- 829 CATALDI, E, P DI MARCO, A MANDICH & S CATAUDELLA. 1998. Serum
830 parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes):
831 effects of temperature and stress. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 121(4): 351-354.
- 832 COLBURN, HR, AB WALKER, DL BERLINSK & GC NARDI. 2008. Factors
833 affecting survival of cobia, *Rachycentron canadum*, during simulated transport. *J.*
834 *World Aquacult. Soc.*, 39(5): 678-683.
- 835 DALLA VIA, J, G VAN DEN THILLART, O CATTANI & P CORTESI. 1997.
836 Environmental versus functional hypoxia/anoxia in sole *Solea solea*: the lactate
837 paradox revisited. *Mar. Ecol-Prog. Ser.*, 154: 79-90.
- 838 DALLA VIA, J, G VAN DEN THILLART, O CATTANI & P CORTESI. 1998.
839 Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic
840 exposure. *Can. J. Zoolog.*, 76(11): 2108-2113.
- 841 DAVIS, KB. 2004. Temperature affects physiological stress responses to acute
842 confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Comp.*
843 *Biochem. Phys. A.*, 139(4): 433-440.
- 844 DENG, L, WM ZHANG, HR LIN & CHK CHENG. 2004. Effects of food deprivation
845 on expression of growth hormone receptor and proximate composition in liver of
846 black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 137: 421-432.
- 847 ĎURAČKOVÁ, Z. 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiol.*
848 *Res.*, 59(4): 459-469.
- 849 FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture
850 Organization of the United Nations.
- 851 FIGUEIREDO, J L & NA MENEZES. 2000. In: Manual de peixes marinhos do sudeste
852 do Brasil. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 33-57 p.
- 853 FONSECA, VF, S FRANÇA, RP VASCONCELOS, A SERAFIM, R COMPANY, B
854 LOPES, MJ BEBIANNO & HN CABRAL. 2011. Short-term variability of multiple

855 biomarker response in fish from estuaries: Influence of environmental
856 dynamics. *Mar. Environ. Res.*, 72(4): 172-178.

857 ERDMAN, MV & L PET-SOEDE. 1996. How fresh is too fresh? The live reef food
858 fish trade in eastern Indonesia. *NAGA. ICLARM. Q.*, 19(1): 4-8.

859 GAO, J, S KOSHIO, M ISHIKAWA, S YOKOYAMA & REP MAMAUAG. 2014.
860 Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance,
861 fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese
862 flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. *Aquaculture*, 422: 84-
863 90.

864 GESTO, M, J HERNÁNDEZ, MA LÓPEZ-PATIÑO, JL SOENGAS & JM MÍGUEZ.
865 2015. Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in
866 rainbow trout and zebrafish. *Comp. Biochem. Phys. A.*, 188: 65-69.

867 GRIM, JM, DRB MILES & EL CROCKETT. 2010. Temperature acclimation alters
868 oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing
869 activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish
870 muscle. *J. Exp. Biol.*, 213(3): 445-452.

871 GROUP ADRIEN, 2015. Disponível em: [http://www.adrien.fr/web/p679_turbot-
872 range.html](http://www.adrien.fr/web/p679_turbot-range.html). Acessado em: 20 de setembro de 2015.

873 HALLIWELL, B & M WHITEMAN. 2004. Measuring reactive species and oxidative
874 damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results
875 mean?. *Brit. J. Pharmacol.*, 142(2): 231-255.

876 HARMON, TS. 2009. Methods for reducing stressors and maintaining water quality
877 associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Rev.
878 Aquacult.*, 1(1): 58-66.

879 HERMES- LIMA, M, DC MOREIRA, GA RIVERA-INGRAHAM, M GIRAUD-
880 BILLOUD, TC GENARO-MATTOS & ÉG CAMPOS. 2015. Preparation for
881 oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal
882 two decades later. *Free Radical. Bio. Med.*, 89: 1122-1143.

883 HUGHES G M. 1973. Respiratory responses to hypoxia in fish. *Am. Zool.*, 13(2): 475-
884 489.

885 HUR, J W, IS PARK & YJ CHANG. 2007. Physiological responses of the olive
886 flounder, *Paralichthys olivaceus*, to a series stress during the transportation process.
887 *Ichthyol. Res.*, 54(1): 32-37.

888 ISHIMATSU, A, T KIKKAWA, M HAYASHI, KS LEE & J KITA. 2004. Effects of
889 CO₂ on marine fish: larvae and adults. *J. Oceanogr.*, 60(4): 731-741.

890 IVERSEN, M, B FINSTAD & KJ NILSSEN. 1998. Recovery from loading and
891 transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168(1):
892 387-394.

893 IVERSEN, M, B FINSTAD, RS McKINLEY, RA ELIASSEN, KT CARLSEN & T
894 EVJEN. 2005. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during
895 commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to
896 sea. *Aquaculture*, 243(1): 373-382.

897 IWAMA, GK. 1998. Stress in fish. *Ann. Ny. Acad. Sci.*, 851(1): 304-310.

898 JIA, R, C HAN, JL LEI, B LIU, B HUANG, HH HUO & ST Yin. 2015. Effects of
899 nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in
900 juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquatic Toxicol.*, 169: 1-9.

901 KING, H R. 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road
902 transport of Atlantic salmon in Tasmania. *J. Vet. Behav.*, 4(4): 163-168.

903 LEE, C & Y SADOVY. 1998. A taste for live fish: Hong Kong's live reef fish
904 market. *NAGA. ICLARM. Q.*, 21(2): 38-42.

905 LIM, LC, P DHERT & P SORGELOOS. 2003. Recent developments and
906 improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquacult.*
907 *Res.*, 34(11): 923-935.

908 LUSHCHAK, VI, LP LUSHCHAK, AA MOTA & M HERMES-LIMA. 2001.
909 Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during
910 anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol-Reg. I.*, 280(1): R100-R107.

911 LUSHCHAK, VI, TV BAGNYUKOVA, V LUSHCHAK, JM STOREY & KB
912 STOREY. 2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and
913 antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int. J. Biochem.*
914 *Cell. Biol.*, 37(6): 1319-1330.

915 LUSHCHAK, VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic
916 animals. *Aquat. Toxicol.*, 101(1): 13-30.

917 MACIEL, FE, CED ROSA, EA SANTOS, JM MONSERRAT & LE NERY. 2004.
918 Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid
919 peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Can. J.*
920 *Zoolog.*, 82(12): 1871-1877.

921

922 MADEIRA, D, C VINAGRE & MS DINIZ. 2016. Are fish in hot water? Effects of
923 warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus*
924 *aurata*. *Ecol. Indic.*, 63: 324-331.

925 MARTÍN, I M, JR GUTIERREZ, JÁ MARTOS-SITCHA, I RASINES, C
926 RODRÍGUEZ, JC MANCERA & O CHEREGUINI. 2014. It is possible to
927 transport *Solea senegalensis* specimens without water? In Aquaculture Europe
928 2014. Acessado em:
929 [www.was.org/easonline/documents/MeetingPresentations/AE2014/AE2014_0137.p](http://www.was.org/easonline/documents/MeetingPresentations/AE2014/AE2014_0137.pdf)
930 [df](http://www.was.org/easonline/documents/MeetingPresentations/AE2014/AE2014_0137.pdf)

931 MARTÍNEZ- ÁLVAREZ, RM, MC HIDALGO, A DOMEZAIN, AE MORALES, M
932 GÁRCIA-GALLEGO & A SANZ. 2002. Physiological changes of sturgeon
933 *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp.*
934 *Biol.*, 205(23): 3699-3706.

935 MARTÍNEZ- ÁLVAREZ, RM, AE MORALES & A SANZ. 2005. Antioxidant
936 defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 15(1-2): 75-88.

937 NOMURA, M, KA SLOMAN, MAG VON KEYSERLINGK & AP FARRELL. 2009.
938 Physiology and behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts during
939 commercial land and sea transport. *Physiol Behav.*, 96(2): 233-243.

940 OAKES, KD & GJ VAN DER KRAAK. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting
941 oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to
942 pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.*, 63(4): 447-463.

943 OSTRENSKY, A, MA MARCHIORI & LH POERSCH. 1992. Toxicidade aguda da
944 amônia no processo produtivo de pós-larvas de *Penaeus paulensis*, Pérez-Farfante,
945 1967. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 64: 383-389.

946 OKAMOTO, MH & LA SAMPAIO. 2012. Sobrevivência e crescimento de juvenis do
947 linguado *Paralichthys orbignyana* criados em diferentes temperaturas. *Atlântica*,
948 34(1): 57-61.

949 PAKHIRA, C, TS NAGESH, TJ ABRAHAM, G DASH & S BEHERA. 2015. Stress
950 responses in rohu, *Labeo rohita* transported at different densities. *Aquaculture*, 2:
951 39-45.

952 PATERSON, BD, MA RIMMER, GM MEIKLE & GL SEMMENS. 2003.
953 Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality
954 deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels
955 of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*, 218(1): 717-728.

956 PICHAVANT, K, J PERSON-LE-RUYET, N LE BAYON, A SÉVERÈ, A LE ROUX
957 & L QUÉMÉNER. 2000. Effects of hypoxia on growth and metabolism of juvenile
958 turbot. *Aquaculture*, 188(1): 103-114.

959 POLLOCK, MS, LMJ CLARKE & MG DUBE. 2007. The effects of hypoxia on fishes:
960 from ecological relevance to physiological effects. *Environ. Rev.*, 15: 1-14.

961 RANSBERRY, V E, TA BLEWETT & GB McCLELLAND. 2016. The oxidative stress
962 response in freshwater-acclimated killifish (*Fundulus heteroclitus*) to acute copper
963 and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Phys. C*, 179: 11-18

964 ROMBENSO, AN, JT TRUSHENSKI, D JIRSA & M DRAWBRIDGE. 2015.
965 Successful fish oil sparing in white seabass feeds using saturated fatty acid-rich
966 soybean oil and 22: 6n-3 (DHA) supplementation. *Aquaculture*, 448: 176-185.

967 SADOVY, Y J, TJ DONALDSON, TR GRAHAM, F MCGILVRAY, GJ MULDOON,
968 MJ PHILLIPS, MA RIMMER, A SMITH & B YEETING. 2003. While stocks last:
969 The live reef food fish trade. Asian Development Bank.
970 <http://hdl.handle.net/11540/2432>. License: CC BY 3.0 IGO.

971 SALBEGO, J, AG BECKER, JF GONÇALVES, CC MENEZES, CG HELDWEIN,
972 RM SPANEVELLO, VL LORO, MRC SCHETINGER, VM MORSCH, BM
973 HEINZMANN & B BALDISSEROTTO. 2014. The essential oil from *Lippia alba*
974 induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after
975 transportation. *Neotrop. Ichthyol.*, 12(4): 811-818.

976 SALIN, K. R. 2005. Live transportation of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) in
977 chilled sawdust. *Aquacult. Res.*, 36(3): 300-310.

978 SAMPAIO, FFD & CA FREIRE. 2016. An overview of stress physiology of fish
979 transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish Fish.*, 1-
980 18.

981 SAMPAIO, LA & A BIANCHINI. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth
982 of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*,
983 269(2): 187-196.

984 SAMPAIO, LA, RB ROBALDO & A BIANCHINI. 2008. Hormone-induced ovulation,
985 natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*
986 (Valenciennes, 1839). *Aquacult. Res.*, 39(7): 712-717.

987 SHABANI, F., U ERIKSON, E BELI & A REXHEPI. 2016. Live transport of rainbow
988 trout (*Onchorhynchus mykiss*) and subsequent live storage in market: Water quality,
989 stress and welfare considerations. *Aquaculture*, 453: 110-115.

990 SHIGUENO, K. 1992. Shrimp culture Industry in Japan. In: Marine Shrimp Culture:
991 Principles and Practices (ed. By A.W. Fast & J.L. Lester), 641-652. Elsevier.

992 SHIM, KB, SJ LEE, HD YOON, CW LIM, YK SHIN, MH JEONG, DG LEE & TI
993 PARK. 2012. Effects of low temperature and starvation on the physicochemical
994 characteristics of muscle of the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J.*
995 *Fish. Aquat. Sci.*, 45(5): 430-437.

996 SCHULTE, PM. 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a
997 variable environment. *J. Exp. Biol.* 217(1): 23-34

998 SIM, SY, P MONTALDI, A MONTALDI & H KONGKEO. 2004. Marine finfish
999 markets in Hong Kong. *Marine finfish markets, economics & trade*, 43p.

1000 SKJERVOLD, PO, SO FJÆRA, PB ØSTBY & O EINEN. 2001. Live-chilling and
1001 crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*).
1002 *Aquaculture*, 192(2): 265-280.

1003 SLANINOVA, A, M SMUTNA, H MODRA & Z SVOBODOVA. 2009. REVIEWS
1004 Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinol. Lett.*, 30(1): 2.

1005 SOMERO, GN. 1973. Thermal modulation of pyruvate metabolism in the fish
1006 *Gillichthys mirabilis*: the role of lactate dehydrogenases. *Comp. Biochem. Phys.*
1007 *B*, 44(1): 205-206.

1008 STAURNES, M, T SIGHOLT, HP PEDERSEN & T RUSTAD. 1994. Physiological
1009 effects of simulated high-density transport of Atlantic cod (*Gadus morhua*).
1010 *Aquaculture*, 119(4): 381-391.

1011 SUN, LT, GR CHEN & CF CHANG. 1992. The physiological responses of tilapia
1012 exposed to low temperatures. *J. Therm. Biol.*, 17(3): 149-153.

1013 SUN, LT, GR CHEN & CF CHANG. 1995. Acute responses of blood parameters and
1014 comatose effects in salt-acclimated tilapias exposed to low temperatures. *J. Therm.*
1015 *Biol.*, 20(3): 299-306.

1016 TANCK, MWT, GHR BOOMS, EH EDING, SE WENDELLAR BONGA & J
1017 KOMEN. 2000. Cold shocks: a stressor for common carp. *J. Fish Biol.*, 57(4): 881-
1018 894.

1019 TIMMONS, MB & JM Ebeling. 2010. Recirculating Aquaculture. 2nd edn. 998
1020 pp. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, New York.

1021 TREASURER, JW. 2012. Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus*
1022 *morhua* L. and stabilisation using buffering agents. *Aquaculture*, 330: 92-99.

1023 TRUSHENSKI J, M SCHWARZ, R TAKEUCHI, B DELBOS & LA SAMPAIO. 2010.
1024 Physiological responses of cobia *Rachycentron canadum* following exposure to low
1025 water and air exposure stress challenges. *Aquaculture*, 307 (1):173-177

1026 UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
1027 Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris,
1028 France.

1029 VINAGRE, C, D MADEIRA, L NARCISO, HN CABRAL & M DINIZ. 2012. Effect
1030 of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in
1031 the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecol. Indic.*, 23: 274-279.

1032 WASIELESKY, W, A BIANCHINI, MHS SANTOS & LH POERSH. 1997. Tolerance
1033 of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquacult.*
1034 *Soc.*, 28: 202-204.

1035 WASIELESKY, W, A BIANCHINI & K MIRANDA-FILHO. 1998. Tolerancia a la
1036 temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marítimo*,
1037 17 (A): 43–48.

1038 WEDEMEYER, GA. 1997. Effects of rearing conditions on the health and
1039 physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, GK, AD
1040 PICKERING, JP SUMPTER & SCHRECK, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in*
1041 *Aquaculture*. Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 62. Cambridge University Press, UK, pp.
1042 35–71.

1043 WENDELAAR BONGA, SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol Ver.*, 77: 591-
1044 625.

1045 WENDELAAR BONGA, SE. 2011. Hormonal responses to stress. *Encyclopaedia of*
1046 *Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, USA, pp1515-1523.

1047 WHITFIELD, M. 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea water a theoretical
1048 study. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 54: 565–580

1049 WRIGHT, PA & CM WOOD. 2012. Seven things fish know about ammonia and we
1050 don't. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 184(3): 231-240.

1051 WU, H, A AOKI, T ARIMOTO, T NAKANO, H OHNUKI, M MURATA, R
1052 HUIFENG & H ENDO. 2015. Fish stress become visible: A new attempt to use
1053 biosensor for real-time monitoring fish stress. *Biosens. Bioelectron.*, 67: 503-510.

1054 WU, RS. 2009. Effects of hypoxia on fish reproduction and development. *Fish*
1055 *Physiol.*, 27: 79-141

- 1056 XIAO, W. 2015. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes. *Sci.*
1057 *China Life. Sci.*, 58(2): 148-155.
- 1058 ZHANG, G, J MAO, F LIANG, J CHEN, C ZHAO, S YIN, L WANG, Z TANG & S
1059 CHEN. 2016. Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish,
1060 *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and
1061 reoxygenation. *Chemosphere*, 151: 271-279.