



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**THAMYRES VANESSA NASCIMENTO DA SILVA**

**EFEITO DO TRANSPORTE EM CONDIÇÕES HIPERÓXICAS SOBRE O  
BALANÇO OXIDATIVO E RESPOSTAS SECUNDÁRIAS DE ESTRESSE EM  
ACARI BOLA (*Peckoltia oligospila*) (GÜNTHER, 1864)**

**RIO GRANDE – RS**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**EFEITO DO TRANSPORTE EM CONDIÇÕES HIPERÓXICAS SOBRE O  
BALANÇO OXIDATIVO E RESPOSTAS SECUNDÁRIAS DE ESTRESSE EM  
ACARI BOLA (*Peckoltia oligospila*) (GÜNTHER, 1864)**

**THAMYRES VANESSA NASCIMENTO DA SILVA**

**ORIENTADOR: DR. JOSÉ MARÍA MONSERRAT**

**CO-ORIENTADOR: DR. LUÍS ANDRÉ NASSR DE SAMPAIO**

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.

**RIO GRANDE – RS**

**FEVEREIRO – 2016**

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Aquicultura no Mundo e no Brasil .....	1
1.2. Mercado ornamental na região Norte do Brasil.....	1
1.3. Transporte de peixes vivos .....	2
1.4. Acari bola ( <i>Peckoltia oligospila</i> ).....	4
1.5. Respostas secundárias de estresse .....	4
1.6. Estresse oxidativo .....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
2.1. Objetivo geral.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
3.1. Material biológico.....	9
3.2. Padronização das concentrações de oxigênio dissolvido.....	9
3.3. Desenho experimental .....	11
3.4. Transporte .....	11
3.5. Parâmetros de qualidade da água.....	12
3.6. Respostas secundárias de estresse .....	13
3.7. Homogeneização dos tecidos .....	14
3.8. Determinação da capacidade antioxidante total.....	15
3.9. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica .....	16
4. Estatística .....	18
<b>5. RESULTADOS</b> .....	18
5.1. Qualidade da água após o transporte.....	18
5.2. Respostas secundárias de estresse .....	21
5.3. Capacidade antioxidante total contra radical peroxil (ACAP) .....	21
5.4. Lipoperoxidação lipídica (TBARS) .....	24
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	32
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	33
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34
<b>ANEXOS</b> .....	46

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às pessoas que mais contribuíram para que eu subisse neste novo degrau na vida: à minha amada mãe Maria Zeneide Nascimento da Silva e meu amado pai José Maria da Silva, os grandes responsáveis pela minha existência e a quem devo meus valores, caráter e disciplina ao trabalho. Igualmente, a minha adorada Glaycilane Gomes de Deus, por sempre ser paciente, generosa e positiva em meus momentos de esmorecimento e falta de estímulo. Ao mesmo tempo, estendo esta dedicatória a minha irmã Thayse Valéria Nascimento da Silva, por me compreender e se mostrar sempre disposta a ajudar.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)*

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

- ❖ À Deus, por não me dar o que não sou capaz de suportar e por manter viva a minha fé, consentindo-me a dádiva da vida, a qual trilho com muito estudo, trabalho e honestidade.
- ❖ A minha família que sempre se esforçou para entender a minha ausência nos vários momentos desde que ingressei no mestrado, até a presente conclusão deste trabalho.
- ❖ Ao meu amigo, professor e orientador Dr. José María Monserrat, o qual confiou em minha capacidade e investiu em mim tempo e paciência, transmitindo através de seu dom de ensinar com simplicidade muito mais do que a teoria, proporcionando-me aprender mais sobre os valores humanos, além de despertar a curiosidade e a vontade de buscar aprender sempre mais.
- ❖ Ao meu co-orientador Dr. Luís André Nassr de Sampaio pelo estímulo ao desenvolvimento desta dissertação, bem como pela presteza, acessibilidade e disposição em apoiar, orientar e disponibilizar os recursos necessários para a realização deste trabalho.
- ❖ Aos meus professores de graduação e hoje amigos Dr. Luis André Luz Barbas e Dr. Marcelo Ferreira Torres pelo incentivo, apoio, paciência, parceria, prestatividade, partilha de conhecimentos e ensinamentos que levarei por toda a vida.
- ❖ A minha estimada amiga Beatriz Miranda, a qual tenho o privilégio de ter em minha vida pela lealdade, cumplicidade, respeito e, principalmente por não medir esforços para me ajudar nos momentos em que mais preciso.
- ❖ Aos amigos (as) Átila Clívea Martins, Mário David Dias Carneiro, Giovanna Stringhetta, Janaína Santos Pedron, Jéssica Teske, João Costa Filho e aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura que contribuíram significativamente para o desenvolvimento deste trabalho.
- ❖ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado.
- ❖ Aos demais professores, aos técnicos e demais profissionais do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, da Estação Marinha de Aquicultura/FURG.
- ❖ A Empresa Amazonstar Comércio de Peixes Ornamentais LTDA, pelo apoio fundamental a esta pesquisa.

## RESUMO

O transporte de organismos aquáticos em sistema fechado é bastante utilizado na aquicultura. A saúde e sobrevivência dos peixes por longos períodos, bem como a manutenção da qualidade da água em boas condições é assegurada pelo método de injeção de oxigênio puro às embalagens de transporte. Entretanto, esses transportes são na maioria das vezes executados de forma empírica, sem que se tenham informações sobre suas implicações fisiológicas. Neste contexto, o presente trabalho buscou analisar o efeito do transporte e da água hiperóxica sobre as respostas secundárias ao estresse (glicemia e osmolalidade plasmática), dano oxidativo lipídico (TBARS) e capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) nas brânquias, cérebro, fígado e músculo de “acari bola” (*Peckoltia oligospila*) submetidos a diferentes tempos (3, 6, 12 e 24 h) de transporte em sistema fechado sob normóxia ( $7 \text{ mg L}^{-1}$ ), hiperóxia moderada (HM =  $13 \text{ mg L}^{-1}$ ) e hiperóxia severa (HS =  $23 \text{ mg L}^{-1}$ ). Não ocorreram alterações na glicemia e osmolalidade plasmática. Ao final do transporte não foram detectadas mortalidades em quaisquer das concentrações de oxigênio dissolvido e tempos de transporte. A qualidade da água apresentou menor acúmulo de amônia nos tratamentos HM e HS em comparação aos níveis na água dos animais transportados em normóxia após 24 h. O fígado apresentou menor ACAP após 6 h sob HS, enquanto que, no músculo observaram-se oscilações ao longo de 24 h em peixes sob normóxia, sendo esta atribuída, em tese, ao ritmo circadiano assim como verificado em peixes e camarões. Nas brânquias após 12 h a ACAP em HS diminuiu em relação aos peixes em normóxia e HM no mesmo tempo, ao passo em que no cérebro, a ACAP foi menor após 3 h de transporte sob normóxia, voltando a aumentar após 6 h e, mantendo-se similar nos outros tempos de transporte e tratamentos. O conteúdo de TBARS no fígado reduziu em 6 sob HS em relação aos peixes transportados sob normóxia, mas em 12 h o transporte em HM determinou maior dano lipídico em comparação ao traslado de 6 e 24 h em HM. No músculo a concentração de TBARS foi menor após 12 h sob HS em comparação aos peixes em normóxia no mesmo tempo. Por fim, nas brânquias e no cérebro não foram observadas alterações significativas. Em conclusão, apesar das variações observadas na ACAP, sobretudo no músculo, a competência antioxidante nos órgãos pareceu ser suficiente para a preservação dos mesmos contra estresse oxidativo, não ocorrendo agravamento de dano lipídico em função do tempo de transporte ou concentração inicial de oxigênio dissolvido. Visto que a hiperóxia proporcionou menor acúmulo de amônia ao final do transporte mais longo (24 h), recomenda-se para esta espécie o uso de altas concentrações de oxigênio na água. Novas análises devem ser realizadas para melhor elucidar os mecanismos responsáveis pelos baixos níveis de lipoperoxidação em peixes submetidos a transporte em hiperóxia.

**PALAVRAS-CHAVE:** oxigênio, osmolalidade, peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Transport in closed systems is frequently used in aquaculture. The health of fish and higher survival rates, as well as the maintenance of good water quality for long periods rely on the injection of pure oxygen to the transport bags. However, protocols for the transport of live fish in most cases are self-taught and empirical, with the use of hyperoxic water injected with pure oxygen, without being aware of the implicated physiological effects. In this context, this study aimed to analyze the effect of transport in hyperoxic condition on the secondary stress responses (blood glucose and plasma osmolality), lipid peroxidation (TBARS) and total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) in gills, brain, liver and muscle of “acari bola” (*Peckoltia oligospila*) subjected to different times (3, 6, 12 and 24 h) of transportation in plastic bags under normoxic (7 mg L<sup>-1</sup>), moderate hyperoxia (MH = 13 mg L<sup>-1</sup>) and severe hyperoxia (SH = 23 mg L<sup>-1</sup>). No changes in blood glucose and plasma osmolality were observed. Lower ammonia levels were observed in treatments MH and SH compared to the levels in the water of animals transported for 24 h in normoxia. ACAP decreased in liver after 6 h in SH, whereas in muscle was observed oscillations during 24 h in fish under normoxia, which in theory, can be attributed to the circadian rhythm, as has been observed in fish and shrimp. ACAP decreased in gills after 12 h in SH compared to fish in normoxia and MH transported for the same time, whereas in brain, ACAP was lower in 3 h of transport under normoxia, increasing again after 6 h, and being similar to the other transport time and treatments. The TBARS content in liver decreased after 6 h of transport under SH compared to fish under normoxia, whereas after 12 h in MH a greater lipid damage was observed compared to transports in MH for 6 and 24 h. Muscle TBARS was lower at 12 h in SH compared to fish in normoxia within the same time. Finally, no significant changes were observed in gills and brain. In conclusion, although variations in the ACAP were observed, mainly in muscle, antioxidant competence in organs seem to be sufficient for the preservation thereof. No further aggravation of lipid damage as a function of transport time or initial oxygen concentration occurred. Since hyperoxia determined less ammonia build up in the water after 24 h transport, high concentration of oxygen is therefore recommended. Further research is needed to elucidate the mechanisms involved in keeping low levels of lipid peroxidation in fish tissues subjected to transport in hyperoxia.

**KEY-WORDS:** oxygen, osmolality, lipid peroxidation, total antioxidant capacity, oxidative stress.

## **1. INTRODUÇÃO**

### ***1.1. Aquicultura no Mundo e no Brasil***

A aquicultura é uma atividade econômica responsável pela produção em cativeiro de organismos aquáticos ou predominantemente aquáticos (FAO, 2014; 2012). Sua produção mundial foi estimada em 90,4 milhões de toneladas em 2012, em que deste total 24 milhões de toneladas correspondiam a plantas aquáticas. Nessa estatística, a América Latina foi responsável por aproximadamente 2,5 milhões de toneladas (FAO, 2014). Segundo os dados preliminares do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013) do ano de 2013, o Brasil produziu aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado, em que desse total 40% foi proveniente de atividades de aquicultura que entre os anos de 2003 e 2009 tiveram um acréscimo de produção de 35%.

Em 2011 o país alcançou cerca de 620 mil toneladas de pescado produzido pela aquicultura (MPA, 2011). Entretanto, mesmo com crescimento significativo na aquicultura nacional e, excluindo-se a produção de plantas aquáticas, bem como produtos não destinados à alimentação, a produção brasileira representou em 2012 apenas 1,1% da produção mundial em aquicultura (FAO, 2014). A aquicultura nacional continental corresponde a cerca de 86% do total da atividade aquícola, ocorrendo um incremento de 38% de 2010 para 2011 (MPA, 2011).

A Amazônia é detentora de uma gama de espécies dulcícolas com potencial para a piscicultura tanto de corte como ornamental, porém tal atividade ainda está em desenvolvimento nesta região, apesar de que em outras regiões do país já se encontra notavelmente desenvolvida (Saint-Paul, 1986; Val; Honczaryk, 1995; Val *et al.*, 2000). O Estado do Pará, por exemplo, mesmo dotado de características favoráveis para instalação de empreendimentos aquícolas, contribui com apenas 1,6% da produção anual da aquicultura no país. O Pará supera apenas os Estados do Acre e Amapá no que diz respeito a produção em cativeiro de organismos aquáticos na região amazônica (MPA, 2011).

### ***1.2. Mercado ornamental na região Norte do Brasil***

O Brasil possui aproximadamente 3.322 espécies de peixes de água doce conhecidas (FishBase, 2015a), havendo uma diversidade a ser catalogada (Buckup *et al.*, 2007). No ano de 2014, o Brasil ocupou a 9ª posição no ranking mundial de

exportadores de peixes ornamentais, com rendimentos de US\$ 13 milhões de dólares (ONU, 2014). A bacia Amazônica é uma das principais fornecedoras de peixes ornamentais capturados de água doce em larga escala para os maiores centros de distribuição e venda de peixes ornamentais do mundo situados nos Estados Unidos, Japão e Alemanha, gerando uma receita de cerca de 3 milhões de dólares anuais (Chao *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2007).

Por outro lado, as capturas em geral não são registradas, o que abre margem à sobrepesca e, por conseguinte, a redução do estoque ictiológico (FAO, 2000; Tlusty *et al.*, 2005). Mesmo assim, a Amazônia brasileira exportou em 2007 cerca de 25 milhões de peixes ornamentais, dos quais 40 mil eram exemplares de *Peckoltia spp.* (IBAMA, 2007). Entre os estados brasileiros, além do Amazonas, o Pará também se destaca em termos de exportação de peixes ornamentais (IBAMA, 2008).

Em 2007, o Estado do Pará exportou 1 milhão de espécimes ornamentais de água doce (IBAMA, 2007). Ainda neste estado, especificamente na Bacia do Rio Guamá/PA registrou-se em 2006 uma receita de R\$ 34.000,00 reais, saldo decorrente da comercialização de 452 mil exemplares de 49 espécies endêmicas. Daquela receita total gerada com a pesca ornamental, quatro espécies de acaris (menos de 10% dos desembarques) contribuíram com 56% dos rendimentos, são eles: pinima (*Leporacanthicus galaxias*) (28%), bola (*Peckoltia oligospila*) (13%), picota (*Peckoltia sp.*) (8%) e assacu (*Pseudacanthicus spinosus*) (7%) (Torres *et al.*, 2007).

### **1.3. Transporte de peixes vivos**

Para atender este mercado rentável, o transporte tem sido uma importante ferramenta logística, sendo praticado para realizar a movimentação de cargas de organismos aquáticos, oriundos tanto da pesca quanto da aquicultura (King, 2009). O sistema mais frequente de transporte de peixes vivos é o do tipo fechado, geralmente empregado para o transporte de peixes em fases iniciais, reprodutores (em baixa densidade) e uma variedade de peixes ornamentais (Girdler *et al.* 2010). Esta modalidade é realizada em sacos de polietileno duplo, adicionados de um terço do seu volume em água e dois terços injetados com oxigênio puro. Depois de lacrados, são mantidos em caixas de isopor para garantir o isolamento dos peixes em relação às

mudanças externas de temperatura, bem como da luz até o seu destino final (Chuan *et al.*, 2003; FAO, 2007).

A mortalidade durante o transporte pode ocorrer em função das alterações da qualidade da água, que em função do tempo se deteriora em sistemas fechados (Rimmer; Franklin, 1997) refletindo, por exemplo, na diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (OD), acúmulo de fezes, aumento da excreção de compostos nitrogenados, aumento da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e acidificação do pH (Girdler *et al.* 2010), bem como injúrias físicas sofridas durante os procedimentos de captura, embalagem, carga e descarga, que induzem os animais ao estresse sujeitando-os às doenças que podem levá-los à morte no pós-transporte (Barton; Iwama, 1991; Rottmann; Francis-Floyd; Durborow, 1992).

Considerando que a qualidade da água é um dos fatores decisivos para o transporte (Girdler *et al.* 2010), proporcionar níveis adequados de oxigênio dissolvido torna-se essencial, pois a disponibilidade desse gás é decisiva para a sobrevivência dos peixes justamente por suprir o processo de respiração, o qual promove a redução dos níveis de OD, aumentando as chances de intoxicação via CO<sub>2</sub> e favorecendo o acúmulo de amônia através da excreção de compostos nitrogenados na água (Paterson *et al.*, 2003; Datta, 2012; Baldisserotto, 2013).

Por outro lado, tem sido reportado que o suprimento em excesso de O<sub>2</sub> induz à doença das bolhas, cuja principal característica é a formação de bolhas de gás na cabeça e no revestimento peritoneal da cavidade do corpo e da cavidade oral, dificultando as trocas gasosas através do epitélio branquial e perturbando a homeostase fisiológica de um modo em geral. Outro efeito potencial da hiperóxia é o estresse oxidativo, que provoca oxidação de biomoléculas de forma a danificar ou causar disfunção nas células (Espmark *et al.*, 2010; Lemarié *et al.*, 2011). De modo geral, técnicas de transporte de peixes vivos são geralmente aprendidas e repassadas de forma empírica, utilizando-se com frequência de sistemas fechados e água hiperóxica proporcionada pela adição de oxigênio puro nas embalagens, sem que se conheçam os impactos fisiológicos de tal exposição.

#### **1.4. *Acari bola (Peckoltia oligospila)***

O *Peckoltia oligospila* (código de identificação L006) é um peixe demersal popularmente conhecido por acari bola ou cascudo leopardo é um peixe da classe Actinopterygii, da ordem Siluriforme, pertencente à família dos Loricarídeos, distribuídos na América do Sul, especificamente na Bacia do Rio Amazonas no Brasil (FishBase, 2015b). Os peixes do gênero *Peckoltia* são geralmente de pequeno porte alcançando pouco mais de 10 cm. Em particular, o acari bola é caracterizado por sua coloração castanha, com manchas marrom-arredondadas ao longo do corpo, inclusive na cabeça (Armbruster, 2008). Este animal habita ambientes de água doce, com pH entre 6,5 e 7,2 e temperatura de 23° C a 27° C. Selvagens deste espécime são onívoros, se alimentando de raspas de madeiras, microalgas e pequenos invertebrados aquáticos (FishBase, 2015b) (Anexo I).

#### **1.5. *Respostas secundárias de estresse***

O estresse é o estado em que o equilíbrio fisiológico ou homeostático é perturbado ou influenciado por um agente interno ou externo, designado estressor (Pickering, 1981). Os peixes possuem capacidade natural para responder fisiologicamente, fazendo uso de mecanismos adaptativos, com intuito de reduzir o estresse ou eliminar distúrbio imposto (Barton e Iwama, 1991; Galhado; Oliveira, 2011).

A resposta ao estresse envolve uma série de alterações fisiológicas que agem de forma integrada, sendo classificadas na literatura como respostas primárias, secundárias e terciárias. As respostas primárias são mudanças neuroendócrinas imediatas, que estimulam a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteróides (cortisol), ao passo em que as respostas secundárias compreendem mecanismos metabólicos, como a alteração na glicemia, no ácido láctico e no glicogênio hepático/muscular, bem como alterações no hematócrito, número de linfócitos e no balanço hidromineral. Por fim, a resposta terciária que compreende os efeitos negativos do estresse refletidos na perda de desempenho reprodutivo e na redução da resistência a doenças e, quando o estresse sofrido é severo, o peixe pode perder sua capacidade de adaptação, alcançando um estado de exaustão, que muitas vezes podem levar a morte (Mommsen *et al.*, 1999; Wendelaar-Bonga, 1997; Barton e Iwama, 1991).

## 1.6. *Estresse oxidativo*

Quando sob concentrações elevadas de oxigênio, os peixes podem sofrer com estresse oxidativo favorecido em função do aumento da concentração daquele gás (Kunwar; Priyadarsini, 2011). Este quadro é gerado por alterações nas reações de transferência de elétrons, que resultam em um desequilíbrio entre agentes oxidantes, especialmente espécies reativas de oxigênio (ROS – termo em inglês) e antioxidantes, podendo causar assim danos às macromoléculas (Jones, 2006).

ROS é um termo coletivo que designa um grupo de oxidantes ou espécies moleculares, capazes de oxidar biomoléculas, podendo ser também radicais livres (Kunwar; Priyadarsini, 2011). Em adição, podem ser produzidos por diferentes tecidos via reações de redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ), ocorrendo simultaneamente a geração de vários elementos intermediários tóxicos e reativos, tais como, radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Hermes-Lima, 2004). Dados dos efeitos de estado hiperóxico na geração de danos oxidativos nos tecidos e defesas antioxidantes são limitados (Lushchak; Bagnyukova, 2006) e inexistentes para *P. oligospila*.

Em seres aeróbicos, existem várias vias metabólicas que permitem a formação do ROS, dentre elas a cadeia respiratória nas mitocôndrias, devido a maior probabilidade de os elétrons “escaparem” da cadeia transportadora de elétrons, ao nível da Coenzima Q, entre os complexos I e III para se unir ao oxigênio molecular gerando o  $O_2^{\cdot-}$  (Kunwar; Priyadarsini, 2011; Lushchak, 2011). A redução tetravalente do  $O_2$  à água metabólica ( $H_2O$ ) também é uma via para a geração do  $O_2^{\cdot-}$ , bem como seus intermediários reativos como os radicais hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $\cdot OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Em meio aquoso, a reação principal do radical ânion  $O_2^{\cdot-}$  é a dismutação via superóxido dismutase (SOD), produzindo uma molécula de  $H_2O_2$  e uma molécula de  $O_2$  (Vogt, 1995; Barreiros *et al.*, 2006).

Por isso, quando no decorrer da evolução o  $O_2$  tornou-se essencial para o processo de respiração mitocondrial (Zehnder; Svensson, 1986), houve em paralelo o desenvolvimento de um sistema de defesa antioxidante com papel de resguardar as células da toxicidade daquele gás, eliminando ROS e/ou prevenindo danos oxidativos,

toda vez que o metabolismo aeróbico inevitavelmente venha promover a geração de ROS (Urso; Clarkson, 2003; Comporti, 2010).

Por outro lado, o advento do oxigênio no planeta permitiu vantagens energéticas (Zehnder; Svensson, 1986), que garantiram o surgimento de organismos multicelulares mais complexos e maiores; sistema de transporte de oxigênio para tecidos; e controle da distribuição desse gás (Fridovich, 1998; Decker; Holde, 2010). Todavia, aqueles que não se adaptaram ao ambiente oxidativo, acabaram sendo extintos em massa ou se adaptaram a ambientes com disponibilidade restrita de oxigênio, o que permitiu a sobrevivência de organismos anaeróbicos (Fridovich, 1998; Thannickal, 2009).

O sistema de defesa antioxidante é classificado em enzimático e não enzimático, sendo este último constituído por uma grande diversidade de substâncias, que podem ter origem exógena ou dietética como, por exemplo,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C) e flavonóides (Anderson, 1998; Dickinson; Forman, 2002; Lykkesfeldt; Svendsen, 2007, Lobo *et al.*, 2010). Já as defesas antioxidantes enzimáticas são proteínas sintetizadas pelo próprio organismo (Mariano *et al.*, 2009), das quais podemos citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (Gr), glutathione S-transferase (GST) (Hermes-Lima, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010;).

Todas as enzimas citadas anteriormente têm função de retardar, impedir ou remover dano oxidativo a moléculas alvo (Halliwell; Gutteridge, 2007). Em suma, os antioxidantes enzimáticos resguardam as biomoléculas ao promover a degradação do radical ânion  $O_2^{\cdot-}$ , assim como de agentes pró-oxidantes menos reativos, como, por exemplo, o  $H_2O_2$ . Antioxidantes não enzimáticos intervêm no combate as ROS ou na recuperação de biomoléculas oxidadas (Barbosa *et al.*, 2010). Estas constituem em conjunto um sistema de defesa antioxidante complexo (Amado *et al.*, 2009) e, a mensuração das atividades antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, possibilita avaliar a capacidade antioxidante total do organismo contra moléculas oxidantes (Lushchak, 2011).

Entretanto, quando a produção e acumulação de ROS via agentes estressores está além da capacidade de desintoxicação do sistema de defesa antioxidante (Halliwell; Gutteridge, 1986) desencadeia-se o estresse oxidativo, ou seja, o desbalanceamento

entre as concentrações elevadas de pró-oxidantes sobre antioxidantes (Halliwell; Whiteman, 2004). A interação de ROS com biomoléculas gera oxidação delas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra tecidos, o que inclui danos em lípidos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (Halliwell; Whiteman, 2004; Jones, 2006; Barbosa *et al.*, 2010; Dogan *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011; Lushchak, 2011; Vinagre *et al.*, 2012).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é uma reação em cadeia, constituída por etapas de iniciação, propagação e terminação. A reação inicia-se com sequestro do hidrogênio (H<sup>•</sup>) de um ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular, por OH<sup>•</sup> ou LO<sup>•</sup> (radical alcoxila), gerando L<sup>•</sup> (radical lipídico) e LOO<sup>•</sup> (radical peroxila). Este último reinicia o processo descrito anteriormente, caracterizando a propagação. A consumação da lipoperoxidação incide quando os radicais L<sup>•</sup> e LOO<sup>•</sup> gerados nas fases anteriores se conjugam (Ferreira; Matsubara, 1997; Braun *et al.*, 2008; Kunwar; Priyadarsini, 2011) (Figura 1).

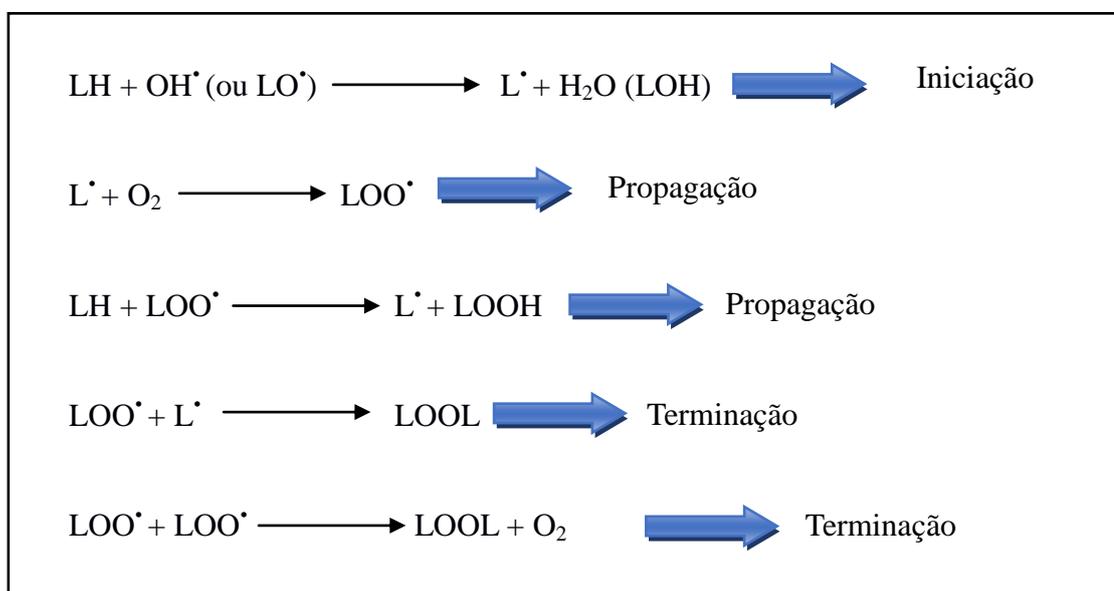


Figura 1- Esquematização das etapas da peroxidação lipídica - adaptado de Ferreira e Matsubara (1997).

Porém, antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol podem interferir neste processo efetuando a estabilização dos ácidos graxos insaturados e quebrando as cadeias de peróxidos (LOO<sup>•</sup>), bem como precavendo a formação de hidroperóxidos lipídicos em sua fase inicial por meio da doação de um átomo de hidrogênio a essa espécie reativa,

resultando em um radical alfa-tocoferoxil ( $\text{TO}^{\bullet}$ ), o qual é regenerado novamente à alfa-tocoferol (TOH) via doação de elétrons pelo ácido ascórbico (Di Mascio *et al.*, 1991; Packer, 1991; Fogaça; Sant'ana, 2009; Gülçin, 2012).

Todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, podendo resultar em morte celular (Vasconcelos *et al.*, 2007). O cérebro, por exemplo, é um órgão especialmente suscetível a danos oxidativos. Apesar da alta taxa de produção de ROS, causado pela elevada taxa de metabolismo oxidativo e abundância de ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular, o cérebro tem um sistema de defesa antioxidante relativamente baixo (Matés, 2000).

Neste contexto, estressores recorrentes no contexto da aquicultura, a exemplo do transporte em água com oxigênio dissolvido supersaturado, podem impactar negativamente o balanço oxidativo de organismos aquáticos e, portanto, necessitam ser caracterizados para que o manejo possa ser ajustado de forma a minimizar os efeitos deletérios do estresse. Em adição, informações sobre a fisiologia de peixes, sobretudo no que tange ao estresse oxidativo de animais transportados em condições de hiperóxia são relativamente limitadas, principalmente em relação a espécies amazônicas de interesse comercial.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. *Objetivo geral***

Investigar o efeito do transporte e oxigênio dissolvido supersaturado sobre as respostas secundárias de estresse e o balanço oxidativo em *P. oligospila*, submetidos a transporte por até 24 h em sistema fechado sob diferentes concentrações de oxigênio dissolvido.

### **2.2. *Objetivos específicos***

- Verificar se os tempos de transporte (3, 6, 12 e 24 h) e as concentrações de oxigênio dissolvido (normóxia,  $13 \text{ mg L}^{-1}$  e  $23 \text{ mg L}^{-1}$  de oxigênio puro) alteram os níveis de glicemia e a osmolalidade plasmática de acaris bola.

- Determinar o dano oxidativo lipídico e a capacidade antioxidante total em brânquias, cérebro, fígado e músculo de acaris bola submetidos à normóxia,  $13 \text{ mg L}^{-1}$  e  $23 \text{ mg L}^{-1}$  de oxigênio puro nos diferentes tempos de transporte.

- Mensurar os parâmetros de qualidade da água ao decorrer dos diferentes tempos de transporte nos diferentes tratamentos de oxigênio dissolvido.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. *Material biológico*

Um total de 360 exemplares de acari bola com peso médio de  $30,39 \pm 13,99$  g e comprimento médio de  $14,6 \pm 1,0$  cm foi utilizado neste estudo. Os animais passaram previamente por uma quarentena (5 dias) em um sistema composto por caixas de polietileno com volume útil de 20 litros (L) em densidade de 10 peixes por caixa. Posteriormente, foram distribuídos e aclimatados durante 20 dias em aquários com volume útil de 60 L na densidade de 1 peixe/4 L de água.

Durante essas etapas iniciais, os sistemas estiveram sob aeração constante e os parâmetros de qualidade de água foram mantidos nas seguintes condições: temperatura  $27,5 \pm 1,2$  ° C, oxigênio dissolvido  $7,53 \pm 0,4$  mg L<sup>-1</sup>, pH  $6,5 \pm 0,8$ , alcalinidade  $18,33 \pm 8,1$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, dureza  $16,8 \pm 5,5$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h escuro. A taxa de arraçoamento empregada foi de 3% da biomassa dos peixes, oferecida duas vezes ao dia, com ração comercial Sera Wells Chips contendo 32,2% de proteína bruta (Zuanon *et al.*, 2011). Diariamente as unidades foram sifonadas para retirada de sobras de alimento e fezes.



Figura 2- Acari bola (*Peckoltia oligospila*).

#### 3.2. *Padronização das concentrações de oxigênio dissolvido*

Para a padronização das concentrações-teste de OD em 7, 13 e 23 mg L<sup>-1</sup> (concentrações nominais) dos tratamentos normóxia, hiperóxia moderada (HM) e hiperóxia severa (HS), respectivamente, dez sacos plásticos de 30 L por tratamento foram utilizados e adicionados de 3 L de água oriunda do próprio sistema e inflados com oxigênio puro e/ou ar atmosférico de acordo com a seguinte metodologia (Figura 3):

- Para o tratamento normóxia ( $OD = 7,66 \pm 0,15 \text{ mg L}^{-1}$ ), utilizou-se 3 L de água e completou-se o volume restante dos sacos com ar atmosférico, introduzido nas embalagens por um compressor de ar Vortex Blower – Hailea modelo 290G equipado com uma mangueira cristal (meio giro de abertura na válvula).

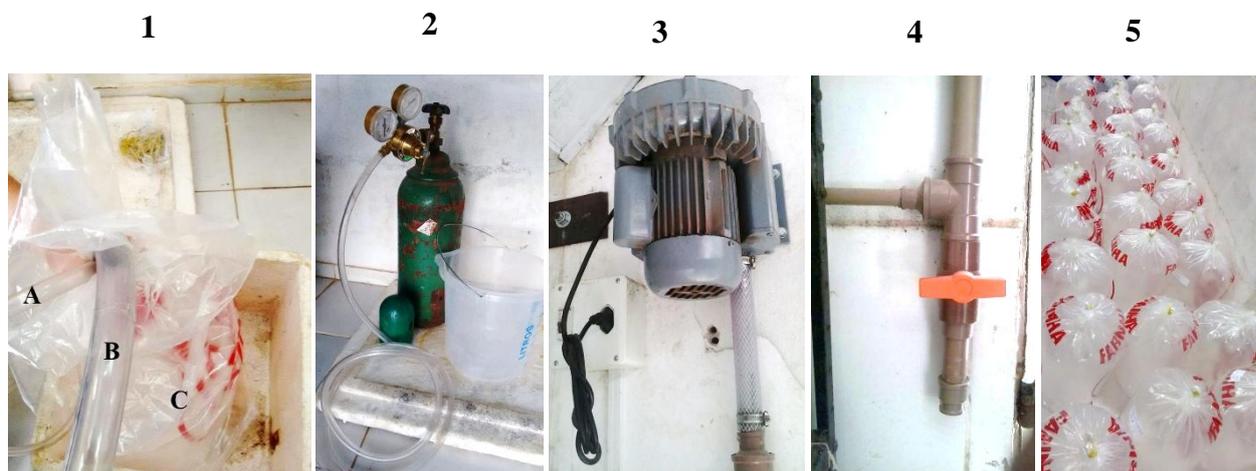


Figura 3- (1) posicionamento da mangueira para oxigênio puro (A), mangueira para ar atmosférico (B) e embalagem dupla plástica (C); (2) cilindro contendo oxigênio puro com capacidade para 7 litros com pressão de serviço de 200 bar, conectado a mangueira cristal; (3) compressor de ar Vortex Blower – Hailea modelo 290G; (4) registro conectado ao compressor de ar; (5) embalagens infladas com oxigênio e ar atmosférico.

- Para o tratamento HM ( $12,42 \pm 0,97 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizou-se 3 L de água e completou-se o volume restante dos sacos na proporção de 1:2 de oxigênio puro e ar atmosférico. O tempo de inflagem correspondeu a aproximadamente 5 e 8 segundos para a injeção de oxigênio puro e ar atmosférico (meio giro de abertura na válvula de ajuste de pressão do cilindro de oxigênio e do blower), respectivamente.

- Para o tratamento HS ( $23,35 \pm 0,80 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizou-se 3 L de água e completou-se o volume restante dos sacos na proporção de 1:2 de ar atmosférico e oxigênio puro. O tempo de inflagem correspondeu a aproximadamente 5 e 8 segundos para a injeção de ar atmosférico e oxigênio puro (meio giro de abertura na válvula do blower e de ajuste de pressão do cilindro de oxigênio), respectivamente.

Durante os testes de padronização, após lacrados e contabilizados 10 minutos, inseriu-se a sonda do oxímetro (medidor multiparâmetro digital portátil Instrutherm modelo ph-1500) no interior dos sacos plásticos, de modo a deixá-la em contato com a água para o registro das concentrações de OD após a estabilização da leitura. Vale ressaltar, que em todos os tratamentos a abertura para a inserção da sonda foi controlada

manualmente de modo a minimizar perdas do oxigênio adicionado. Para a execução dos testes foram utilizadas 10 repetições e as médias obtidas nos testes encontram-se dispostas na Tabela 1.

### 3.3. *Desenho experimental*

Trinta e seis sacos plásticos com volume útil de 30 L corresponderam as unidades experimentais de transporte, divididos igualmente em três tratamentos designados por controle normóxia; HM (13 mg L<sup>-1</sup> de oxigênio) e HS (23 mg L<sup>-1</sup> de oxigênio). Todos os tratamentos foram testados em triplicata em função dos diferentes tempos de transporte (3, 6, 12, 24 h) conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1- Desenho Experimental (S – Saco plástico).

Tratamentos (T)	Tempo de Transporte (h)			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle normóxia	S <sub>1</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>10</sub>
	S <sub>2</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>11</sub>
	S <sub>3</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>9</sub>	S <sub>12</sub>
Hiperóxia moderada (HM)	S <sub>13</sub>	S <sub>16</sub>	S <sub>19</sub>	S <sub>22</sub>
	S <sub>14</sub>	S <sub>17</sub>	S <sub>20</sub>	S <sub>23</sub>
	S <sub>15</sub>	S <sub>18</sub>	S <sub>21</sub>	S <sub>24</sub>
Hiperóxia severa (HS)	S <sub>25</sub>	S <sub>28</sub>	S <sub>31</sub>	S <sub>34</sub>
	S <sub>26</sub>	S <sub>29</sub>	S <sub>32</sub>	S <sub>35</sub>
	S <sub>27</sub>	S <sub>30</sub>	S <sub>33</sub>	S <sub>36</sub>
Horário de início do transporte	05:30	5:40	22:00	15:00

### 3.4. *Transporte*

Previamente ao transporte os animais foram submetidos a jejum por 24 h. Para o transporte, utilizou-se a densidade de 10 peixes/L (de acordo com a densidade empregada para o transporte dessa espécie na região Amazônica) em seus respectivos tratamentos de concentração de OD conforme padronização descrita anteriormente. Em seguida, as unidades foram lacradas com elástico de látex e encerradas em caixas térmicas (170 L) para embarque em veículo automotor e transporte rodoviário (Figura 4).

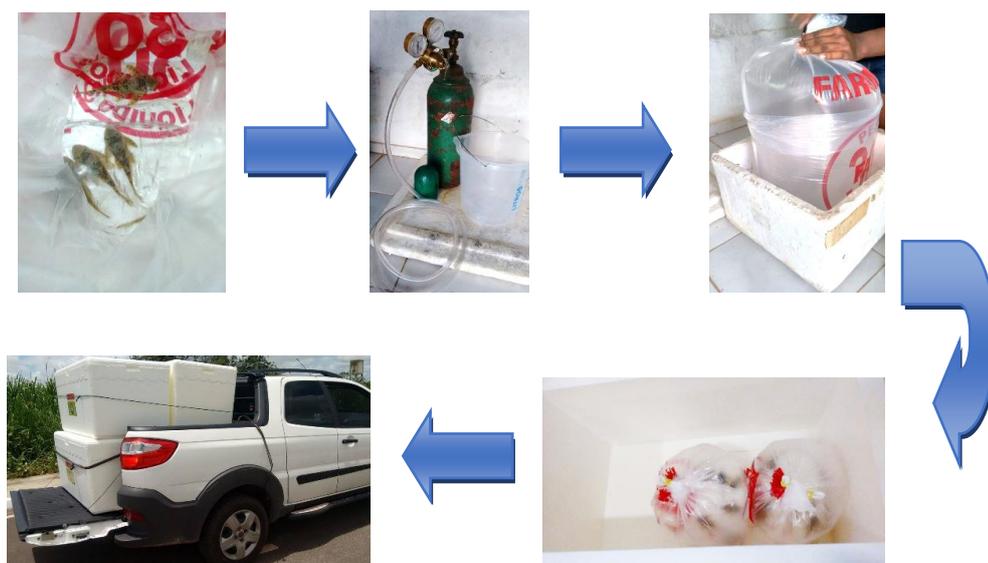


Figura 4. Preparo das embalagens e transporte.

Após os diferentes tempos de transporte (3, 6, 12 e 24 h) os sacos foram abertos para medição dos parâmetros de qualidade da água e dois animais por saco foram retirados para efetuar-se a coleta de 0.2 mL de sangue/peixe via punção de vasos caudais com seringa heparinizada de 1 mL ( $n = 6$  por tratamento). Após a coleta de sangue, cinco animais por saco foram rapidamente eutanasiados ( $n = 15$  por tratamento) por imersão em eugenol (dose letal de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) para coleta de tecidos de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (2013) (Figura 5). Brânquias, cérebro, fígado e músculo (Figura 5) foram coletados, armazenados em tubos eppendorfs (2 mL) e conservados em gelo seco ( $\cong - 78^\circ\text{C}$ ), sendo ao final das coletas congelados em ultra freezer ( $- 80^\circ\text{C}$ ).

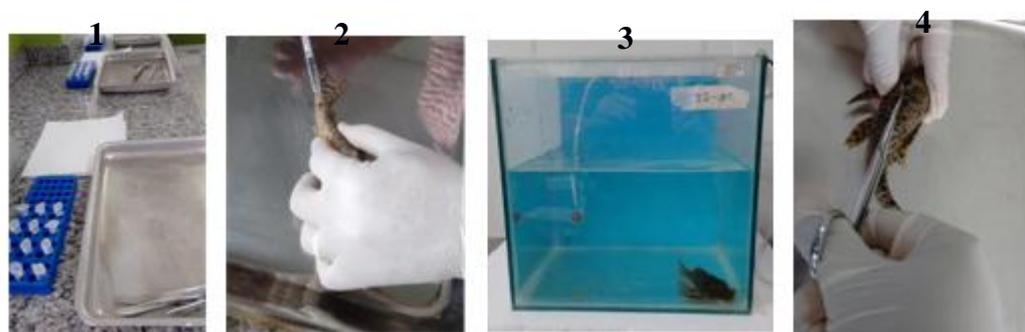


Figura 5- Etapas da coleta: (1) bancada de coleta; (2) coleta de sangue; (3) eutanásia; (4) coleta de tecidos.

Amostras de água foram coletadas antes e após os transportes para a verificação das variáveis. A dureza total foi titulada através do protocolo descrito na NBR 5761; (1984); a alcalinidade total titulada de acordo com Eaton *et al.* (2005); a concentração de CO<sub>2</sub> foi calculada com o software Analysis Salt® (Timmons; Ebeling, 2010). O pH, OD e a temperatura, foram mensurados com auxílio de um equipamento multiparâmetro digital portátil (Instrutherm modelo PH-1500). A amônia nitrogenada total (TAN) foi determinada de acordo com Unesco (1983) e a concentração de amônia não-ionizada foi calculada de acordo através da fórmula proposta por Ostrensky *et al.* (1992) (Figura 6).

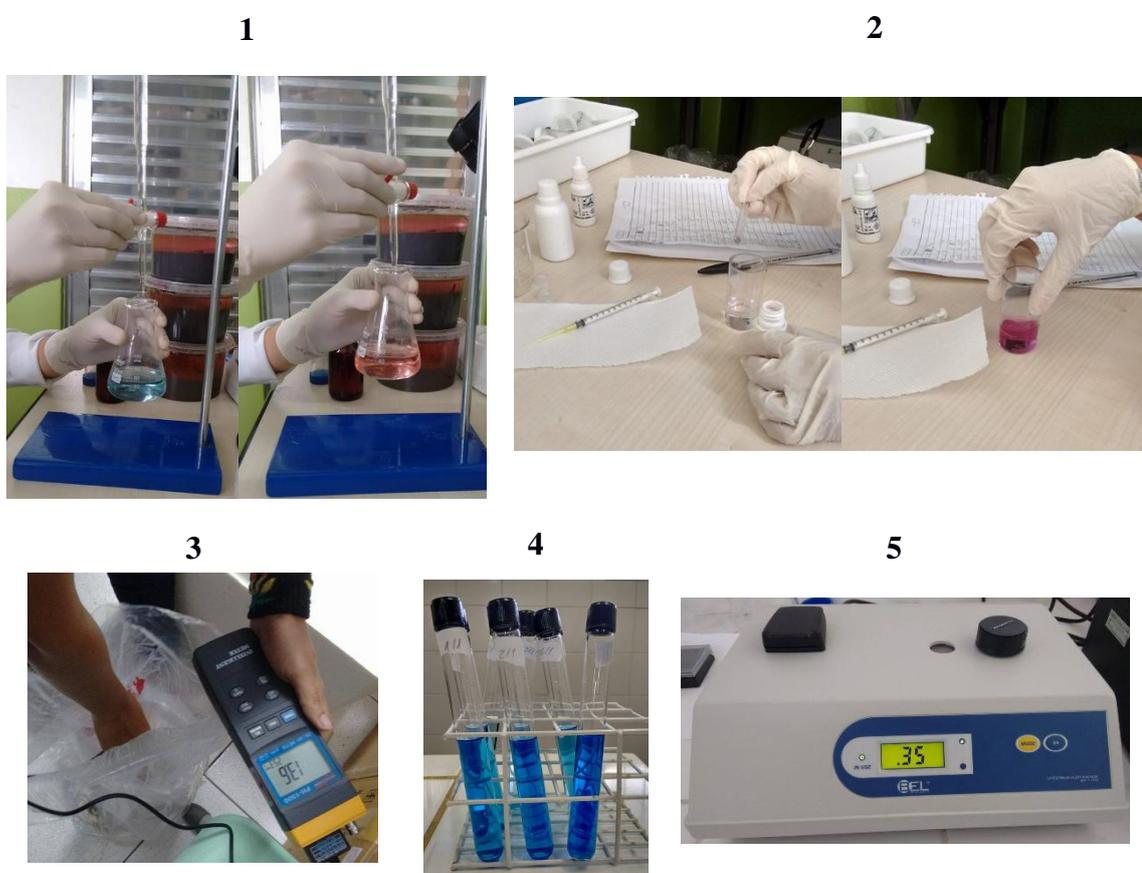


Figura 6- (1) Titulação para determinação da alcalinidade; (2) titulação para determinação da dureza; (3) análise de OD, temperatura e pH; (4) análise de TAN por espectrofotometria; (5) espectrofotômetro utilizado nas leituras.

### 3.6. Respostas secundárias de estresse

A concentração de glicose sanguínea foi aferida imediatamente após a coleta (medidor automático ACCU-CHEK). Para a verificação da osmolalidade plasmática o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm a 4° C e congelado a - 20 °C até o momento das análises em osmômetro de pressão de vapor (Figura 7).

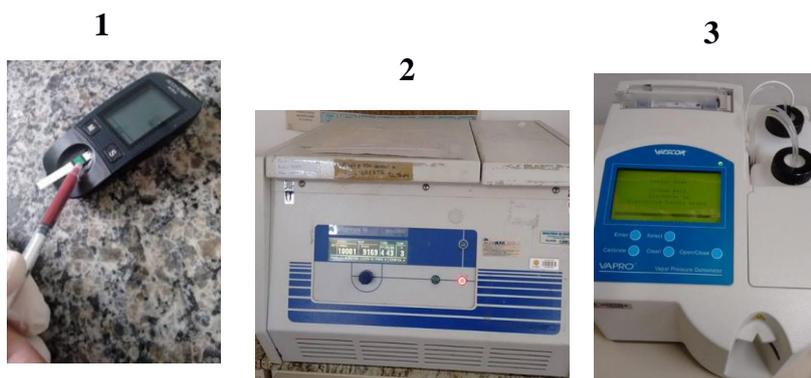


Figura 7- (1) Leitura de glicose; (2) centrífuga para separação do plasma; (3) osmômetro de pressão de vapor.

### 3.7. Homogeneização dos tecidos

Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão constituído de Tris-HCl (100 mM, pH 7,75) mais EDTA (2 mM) e  $Mg^{2+}$  (5 mM), todos dissolvidos em água MilliQ. Considerando a relação 1:5 – peso da amostra (g)/volume de tampão (mL), calculou-se o volume de tampão a ser adicionado em cada tecido para assim submetê-los ao homogeneizador, que através de ação mecânica promoveu a homogeneização dos tecidos (Amado *et al.*, 2009; Amado *et al.*, 2011) (Figura 8).



Figura 8- (1) Pesagem dos tecidos em balança de analítica de precisão; (2) homogeneização dos tecidos; (3) etapa de centrifugação do homogeneizado; (4) disposição do pellet e do sobrenadante após centrifugação.

Em seguida, os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 10.000 x g durante 20 minutos a 4° C e o sobrenadante reservado para todas as medições descritas a baixo (Figura 8). De antemão, determinou-se o conteúdo de proteína total pelo método do Biureto ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ) com Kit de Proteínas Totais Doles, em triplicata, utilizando um leitor de microplacas (BioTek LX 800) (Amado *et al.*, 2009; Amado *et al.*, 2011) (Figura 09).

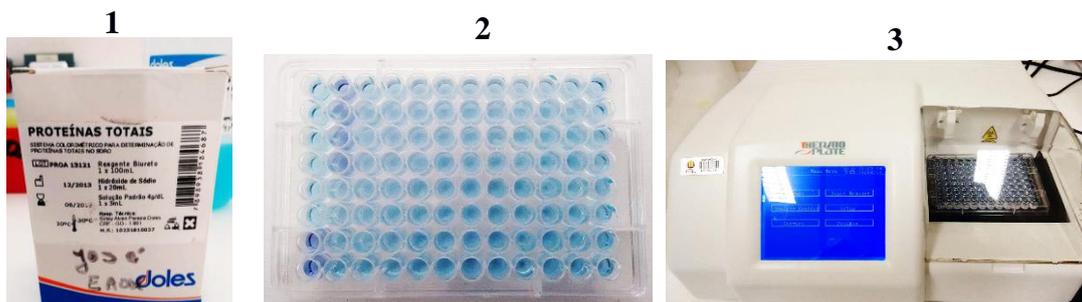


Figura 9- (1) Kit de Proteínas Totais Doles; (2) placa transparente de fundo chato montada; (3) fluorímetro Thermo Plate.

### 3.8. Determinação da capacidade antioxidante total

A competência antioxidante de cada órgão foi determinada através de um método que determina a capacidade antioxidante enzimática e não enzimática contra o radical peróxil, de acordo ao protocolo descrito por Amado *et al.* (2009). Este método consiste na determinação ROS em amostras de tecidos tratados, ou não, com 2,2- azo-bis-2-metilpropianoamidinhidrocloreto (ABAP), que sob termólise promove a produção radicais peróxil.

Para isso, utilizou-se tampão de reação contendo 0,3575 g de ácido etanosulfônico, 4,2-hidroxietil piperazina-1 (HEPES), 0,7455 g de cloreto de potássio (KCL) e 0,0102 g de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) diluídos em 50 mL de água MilliQ em pH ajustado para 7,2. Apenas no momento da dosagem preparou-se solução de 2,7 diclorofluoresceína ( $H_2DCF-DA$ ), misturando 0,5 mg deste em 4,275 mL de etanol 100%. Do mesmo modo, preparava-se solução de ABAP, adicionando-se 0,0271 g deste em 2,5mL de água MilliQ.

Previamente a esta análise, fixou-se 2,0 mg de proteína do extrato das amostras por mL de tampão de homogeneização. Posteriormente preenchia-se cada poça da microplaca branca com 127,5  $\mu$ L de tampão de reação, 10  $\mu$ L de extrato de tecido diluído (2,0 mg/mL), 7,5  $\mu$ L de água MilliQ para a área sem ABAP e 7,5  $\mu$ L de solução ABAP para a área com ABAP, visto que este produz radicais peróxil. Logo em seguida, acrescentava-se 10  $\mu$ L de solução de  $H_2DCF-DA$  em todas as poças, o qual na presença de ROS origina um fluorocromo (o que permite sua quantificação), para assim imediatamente iniciar a leitura de fluorescência em comprimento de onda de 488 nm para excitação e emissão sob temperatura de 37 °C, registrando-se o tempo zero, além

de seis leituras com duração de cinco minutos cada em fluorímetro de placas (Víctor 2, Perkin Elmer) (Figura 10).

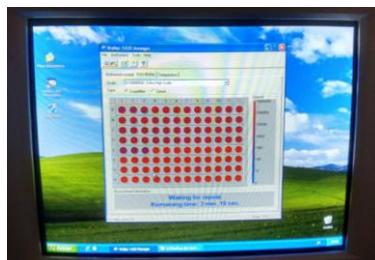


Figura 10- Protocolo ACAP: leituras em seis seções de cinco minutos incluindo o tempo zero.

Em suma, esta técnica mede a competência do tecido em neutralizar ROS, considerando o conjunto de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Assim, calculou-se a produção total de fluorescência agregando as unidades de fluorescência (UF) ao longo do tempo da medição, seguidas o ajuste dos dados UF para uma função polinomial de segunda ordem. É importante mencionar que a área relativa designa a capacidade antioxidante total em que, quanto menor a área relativa maior a capacidade antioxidante. Portanto, o cálculo de competência antioxidante foi efetuado a partir da fórmula:

$$CA = \frac{(\text{ROS área com ABAP} - \text{ROS área sem ABAP})}{\text{ROS área sem ABAP}}$$

### ***3.9. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica***

A peroxidação lipídica foi mensurada através do método fluorométrico descrito por Oakes e Van Der Kraak (2003), que consiste na reação do malondialdeído (MDA) – fruto da deterioração de lipídios peroxidados – com o ácido tiobarbitúrico (TBA) que quando condicionado a elevadas temperaturas e acidez, resulta em um cromógeno que pode ser quantificado por fluorimetria.

Ademais, esta metodologia determina a fluorescência de uma curva padrão de malondialdeído e das amostras. Esta curva é composta por doze pontos (25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78; 0,39; 0,195; 0,0975; 0,04887; 0,0243 e 0,0121 nmol de TMP) alcançada através da diluição de 1 mL da solução mãe de 1,1,3,3-tetramethoxypropano (TMP) (5µl de TMP em 25 mL de água MilliQ) em 1mL de água MilliQ, que finalmente é vortexada para posterior tomada de 1 mL desta mistura para diluição em outro tubo

contendo também 1 mL de água MilliQ, repetindo-se este procedimento até a obtenção de todos os pontos da curva.

Para efetuar esta dosagem previamente foram preparadas solução estoque de hidroxitoluenobutilado (BHT) elaborada a partir de 15,5 mg de BHT diluído em 50 mL de etanol; solução de ácido acético a 20% com pH ajustado à 3,5; solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1% (4,05 g de SDS em 50 mL de água duplamente destilada –ddH<sub>2</sub>O), o qual é um detergente que promove a extração do malondialdeído; solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8% (0,4 g TBA em 50 mL ddH<sub>2</sub>O). A solução de TBA era preparada a cada dosagem realizada (não sendo armazenada ao final das atividades), sendo exposta a alta temperatura a fim de dissolver o TBA, deixando-a atingir temperatura ambiente para ser utilizada.

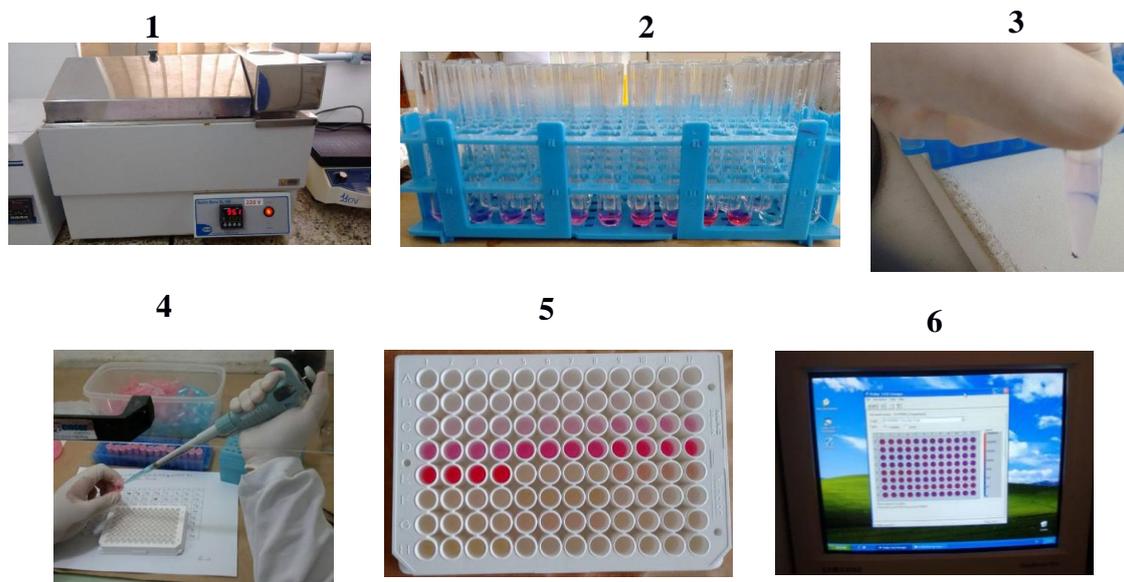


Figura 11- (1) Banho Maria a 95 °C para aquecimento dos tubos; (2) bateria após banho maria; (3) Disposição da fase aquosa e alcoólica após centrifugação; (4) Montagem da microplaca branca em capela; (5) Microplaca montada; (6) Leitura em fluorímetro - protocolo TBARS.

A montagem das baterias em tubos de vidro foi feita do seguinte modo: em duplicata adicionou-se 41,2 µl de cada ponto da curva e 10 µl do extrato homogeneizado. Em seguida acrescentou-se 20 µl da solução estoque de BHT apenas nos tubos que continham amostras. Na sequência 150 µl da solução de ácido acético a 20%, 150 µl da solução de TBA 0,8%, 50 µl de água MilliQ e 20 µl da solução de SDS 8,1%. Logo em seguida, os tubos foram cobertos com papel alumínio e agitados em

vórtex para depois serem aquecidos em banho maria à 95 °C durante trinta minutos (Figura 11-1).

Posteriormente os tubos descansavam 10 minutos para atingir temperatura ambiente, para assim acrescentar 100 µl de água MilliQ em cada tubo e logo transferir o conteúdo para tubos eppendorffs com volume útil de 1,5 mL, os quais em capela recebiam 500 µl de n-butanol para depois serem vortexados e centrifugados à 3000 x g por dez minutos a 15 °C, favorecendo a separação da fase aquosa e da fase alcoólica (Figura 11- 2 e 3).

Para montagem da microplaca (branca), de cada eppendorff transferia-se 150 µl da fase orgânica (sobrenadante), sendo que cada tubo preenchia duas poças. Por fim, inseria-se a microplaca no fluorímetro para a efetuação da leitura em comprimento de excitação de 520 nm e emissão de 580 nm (Victor 2, Perkin Elmer). Os resultados são expressos em nmol de equivalentes de TMP por mg de tecido fresco (Figura 11 – 4, 5 e 6).

#### **4. Estatística**

Os dados dos diferentes parâmetros coletados no transporte foram analisados através de ANOVA de duas vias seguido pelo teste de comparação de médias de Newmann-Keuls, sendo um fator a concentração de oxigênio dissolvido e outro fator o tempo de transporte. Previamente, avaliou-se os pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade, sendo aplicadas as transformações logarítmicas quando necessárias. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média ( $\pm$ ) e em todos os casos foi utilizado um nível de significância de 5%.

### **5. RESULTADOS**

Durante o transporte e ao final do mesmo, nenhuma mortalidade foi observada em quaisquer dos tratamentos de oxigênio dissolvido e tempos de transporte experimentado pelos animais.

#### **5.1. Qualidade da água após o transporte**

Todos os dados relativos à qualidade da água no pós-transporte de acari bola estão sumarizados da Tabela 3.

A concentração de amônia total nos sacos transportados por 3 e 6 h em normóxia não diferiram em relação aos transportados em HM e HS pelo mesmo tempo. Este composto nitrogenado aumentou em função do tempo na água normóxica e foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) ao final de 12 e 24 h em comparação aos transportes em normóxia de menor duração. E, o grupo HM e HS não apresentaram diferenças significativas entre si dentre seus diferentes tempos, ambos acumulando em 24 h uma menor ( $P < 0,05$ ) concentração de TAN em relação aos peixes sob normóxia no mesmo período.

As concentrações de OD ao final do transporte não foram diferentes ( $P > 0,05$ ) em normóxia e HM em função do tempo, mas estes dois grupos foram significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) em comparação ao grupo HS, sendo consequência direta dos protocolos de adição de oxigênio adotados.

A alcalinidade total e a dureza da água não diferiram ( $P > 0,05$ ) em função dos protocolos de adição de oxigênio utilizados ou tempos de transporte, podendo-se notar inclusive semelhança entre os valores dessas variáveis no pós-transporte. Os valores médios de pH e temperatura também não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). Por fim, a concentração de  $\text{CO}_2$  na água esteve elevada em todos os tratamentos de OD e tempos de transporte, mantendo-se inalterada, assim como a concentração de  $\text{N-NH}_3$ , porém apresentando valores extremamente baixos e também sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ).

Tabela 3- Parâmetros de qualidade da água no transporte de acaris bola, *P. oligospila* por diferentes tempos e em distintas concentrações de oxigênio.

		Normóxia	13 mg L <sup>-1</sup>	23 mg L <sup>-1</sup>	
pH	AT		6,05 ± 0,2		
		03 h	5,5 ± 0	5,6 ± 0,1	5,5 ± 0
	DT	06 h	5,5 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,6 ± 0,1
		12 h	5,6 ± 0,1	5,5 ± 0	5,6 ± 0,1
		24 h	6,0 ± 0	5,6 ± 0,1	5,8 ± 0,1
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	AT		26,6 ± 1,9		
		03 h	27,5 ± 2,5	25 ± 2,8	28,3 ± 1,6
	DT	06 h	23,3 ± 1,6	41,6 ± 16,9	30 ± 2,8
		12 h	26,6 ± 1,6	25 ± 2,8	21,6 ± 4,4
		24 h	35 ± 8,6	35 ± 2,8	33,3 ± 1,66
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	AT		24,77 ± 3,2		
		03 h	36 ± 0	33 ± 0	36,3 ± 3,3
	DT	06 h	29 ± 3,2	23,3 ± 0,3	31,3 ± 4,1
		12 h	35,3 ± 2,9	34,3 ± 2,9	29,6 ± 3,7
		24 h	33,6 ± 1,2	27,3 ± 3,5	23,3 ± 2,4
T (°C)	AT		26,39 ± 0,0		
		03 h	25,15 ± 0,4	25,2 ± 0,03 <sup>a</sup>	25,4 ± 0,1
	DT	06 h	25,26 ± 0,4	26 ± 0,17 <sup>ab</sup>	25,9 ± 0,05
		12 h	26 ± 0,06	26,3 ± 0,14 <sup>b</sup>	26,1 ± 0,08
		24 h	25,7 ± 0,1	25,6 ± 0,14 <sup>ab</sup>	25,7 ± 0,06
OD (mg L <sup>-1</sup> )	AT		7,53 ± 0,1		
		03 h	3,1 ± 0,04 <sup>B</sup>	7,5 ± 3,7 <sup>B</sup>	14,9 ± 1,8 <sup>A</sup>
	DT	06 h	2,6 ± 0,2 <sup>B</sup>	9,6 ± 0,9 <sup>B</sup>	18,1 ± 1,7 <sup>A</sup>
		12 h	2,8 ± 0,2 <sup>B</sup>	9,9 ± 1,4 <sup>B</sup>	17,3 ± 1,2 <sup>A</sup>
		24 h	2,9 ± 0,03 <sup>B</sup>	7,3 ± 1,0 <sup>B</sup>	16,4 ± 2,9 <sup>A</sup>
CO <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	AT		92,3 ± 59		
		03 h	233,5 ± 22,5	154 ± 38,9	240 ± 14,5
	DT	06 h	323,6 ± 180,4	473,6 ± 113,2	204 ± 70
		12 h	176 ± 56,3	209,3 ± 23,6	124,6 ± 25,9
		24 h	93 ± 23	237 ± 79,4	156 ± 69,6
TAN (mg L <sup>-1</sup> )	AT		0,31 ± 0,03		
		03 h	1,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,6	4,3 ± 0,2
	DT	06 h	2,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,2	3,9 ± 0,8
		12 h	6,8 ± 1,7 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,6	4,2 ± 0,9
		24 h	10,9 ± 2,2 <sup>Ab</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>B</sup>	6,7 ± 1,3 <sup>B</sup>
N-NH <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	AT		0		
		03 h	0,0003 ± 0	0,0007 ± 0	0,0008 ± 0
	DT	06 h	0,0007 ± 0	0,0003 ± 0	0,0015 ± 0
		12 h	0,0027 ± 0	0,0010 ± 0	0,0013 ± 0
		24 h	0,0067 ± 0	0,0021 ± 0	0,0031 ± 0

Antes do transporte (AT) e depois do transporte (DT). Quando presentes, letras minúsculas ou maiúsculas diferentes nas colunas ou linhas, respectivamente, são significativamente diferentes pelo teste de Newmann-Keuls (P < 0.05), n = 3.

### 5.2. Respostas secundárias de estresse

A tabela 4 a seguir apresenta os dados de glicemia e osmolalidade medidos antes e após os diferentes tempos de transporte e tratamentos de OD. Para ambas as variáveis, não foram detectadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os valores basais e os diferentes tratamentos e tempos testados.

Tabela 4- Glicose sanguínea e osmolalidade plasmática de acari bola transportado em diferentes concentrações de  $O_2$  por diferentes tempos.

[O <sub>2</sub> ]	Tempos de transporte (h)			
	3 h	6 h	12 h	24 h
	<b>Glicose (mg/dL)</b>			
Basal	13,0 ± 0,7			
Normóxia	23,75 ± 4,5	31,0 ± 3,6	24,6 ± 1,2	21,7 ± 2,1
13 mg L <sup>-1</sup>	28,2 ± 4,0	27,0 ± 3,3	20,2 ± 2,0	28,7 ± 5,1
23 mg L <sup>-1</sup>	32,5 ± 3,6	20,4 ± 3,6	18,2 ± 0,9	24,33 ± 5,4
	<b>Osmolalidade (mOm/kg)</b>			
Basal	278 ± 4,9			
Normóxia	266,8 ± 14,2	308,1 ± 13,6	323,5 ± 15,2	299,5 ± 7,5
13 mg L <sup>-1</sup>	283,0 ± 13,5	295,5 ± 7,7	331,0 ± 15	325,2 ± 27
23 mg L <sup>-1</sup>	259,2 ± 10,3	296,6 ± 4,2	307 ± 10,1	295,7 ± 4,9

Não houve diferenças significativas em função dos diferentes tempos de transporte ou concentrações de OD após teste de Newmann-Keuls ( $P < 0,05$ ),  $n = 6$ .

### 5.3. Capacidade antioxidante total contra radical peroxil (ACAP)

O fígado apresentou menor competência antioxidante (maior área relativa) em 6 h nos peixes sob HS quando comparado aos animais em normóxia no mesmo tempo. Também se observou maior ACAP em 6 e 12 h no grupo normóxia e menor ACAP em 24 h no mesmo tratamento de OD. Em HM após 24 h de transporte este parâmetro apresentou aumento significativo na área relativa do que os peixes sob a mesma concentração de OD em 12 h. Por fim, HS em 24 h apresentou menor ACAP em relação aos animais na mesma concentração de OD em 3 h (Figura 12).

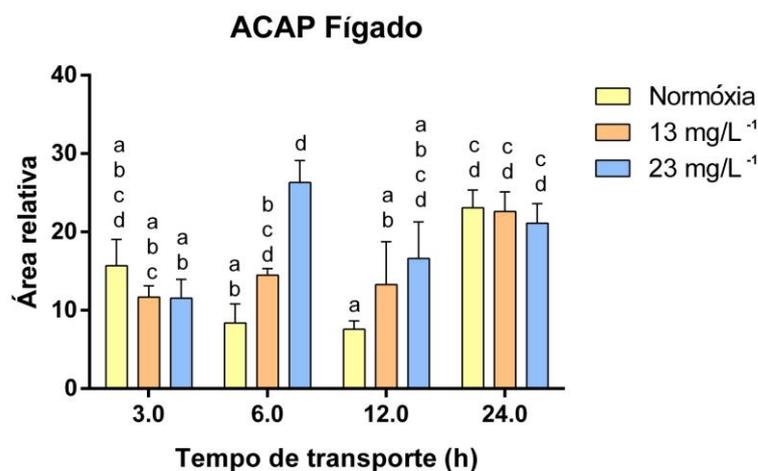


Figura 12- ACAP no fígado de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de O<sub>2</sub>. Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls (P < 0.05).

No músculo não houve diferenças significativas entre as concentrações de O<sub>2</sub> dentro dos mesmos tempos de transporte. Mas, nos animais em normóxia observaram-se oscilações pontuais ao longo dos tempos de transporte. Porém, em 12 h a competência antioxidante dos grupos normóxia e HM aumentaram em comparação aos mesmos tratamentos de OD em 6 h. Mas em 24 h esses mesmos grupos voltaram a reduzir a ACAP em relação aos peixes em 12 h. E, em 24 h o grupo HS reduziu a ACAP em relação ao mesmo tratamento de OD em 12 h de transporte (Figura 13).

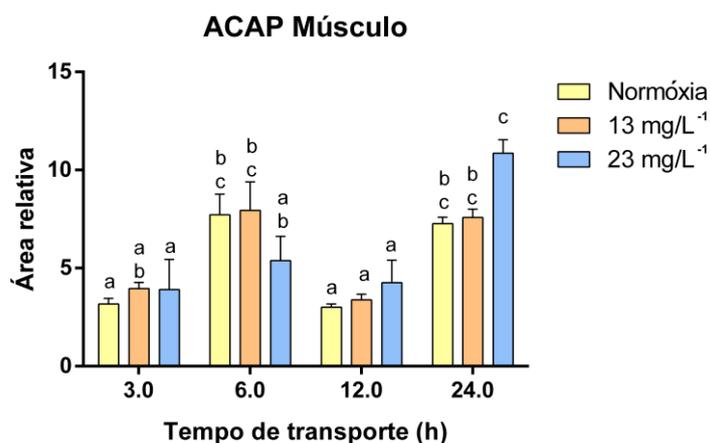


Figura 13- ACAP no músculo de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de O<sub>2</sub>. Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls (P < 0.05).

Nas brânquias o grupo normóxia apresentou diferenças significativas entre a ACAP em 3 h e 6 h, bem como em 12 e 24 h no mesmo tratamento de OD. Para os acaris bola sob HM não foram detectadas diferenças significativas em todos os tempos de transporte. E, em relação ao grupo HS em 3 h a ACAP reduziu ( $P < 0.05$ ) após 6 e 12 h de transporte sob  $23\text{mg/L}^{-1}$ . Contudo, em 24 h o grupo HS não diferiu ( $P > 0.05$ ) do mesmo grupo nos menores tempos de transporte (Figura 14).

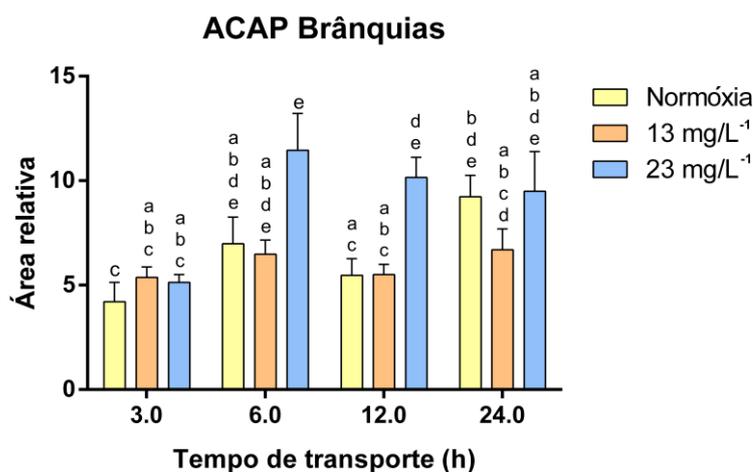


Figura 14- ACAP em brânquias de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de  $O_2$ . Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls ( $P < 0.05$ ).

Em adição, nas 12 h de transporte os peixes em HS apresentaram competência antioxidante significativamente ( $P < 0.05$ ) reduzida quando comparados aos animais em normóxia e HM no mesmo tempo (Figura 14).

O cérebro dos peixes em normóxia após 3 h de transporte demonstraram perda de competência antioxidante em relação aos peixes em HM e HS no mesmo período (Figura 15). Mas, partir de 6 h a ACAP neste tecido aumentou consideravelmente nos peixes em normóxia em relação ao mesmo tratamento de OD em 3 h, não diferindo ( $P > 0.05$ ) dos que estavam sob HM e HS no mesmo tempo, seguindo um padrão semelhante até 12 h após o transporte. Entretanto, após 24 h de transporte os peixes em normóxia tiveram sua ACAP aumentada em relação aos animais em HS no mesmo período (Figura 15).

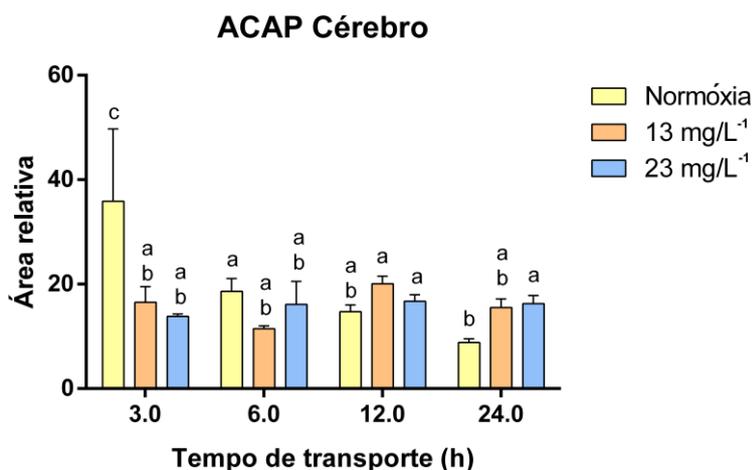


Figura 15- ACAP no cérebro de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de O<sub>2</sub>. Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls ( $P < 0.05$ ).

#### 5.4. Lipoperoxidação lipídica (TBARS)

No fígado os diferentes níveis iniciais de OD após 3 h de transporte não determinaram variação significativa de TBARS dentro do mesmo tempo de transporte, exceto após 6 h onde verificou-se que os níveis de lipoperoxidação no tratamento HS estavam reduzidos ( $P < 0,05$ ) em relação ao tratamento em normóxia no mesmo tempo. Não houve alteração ( $P > 0,05$ ) nas concentrações de TBARS em animais transportados em normóxia em função do tempo. O tempo de transporte de 12 h no tratamento HM determinou TBARS mais elevado ( $P < 0,05$ ) em comparação aos mesmos tratamentos de OD após 6 ou 24 h de transporte (Figura 16)

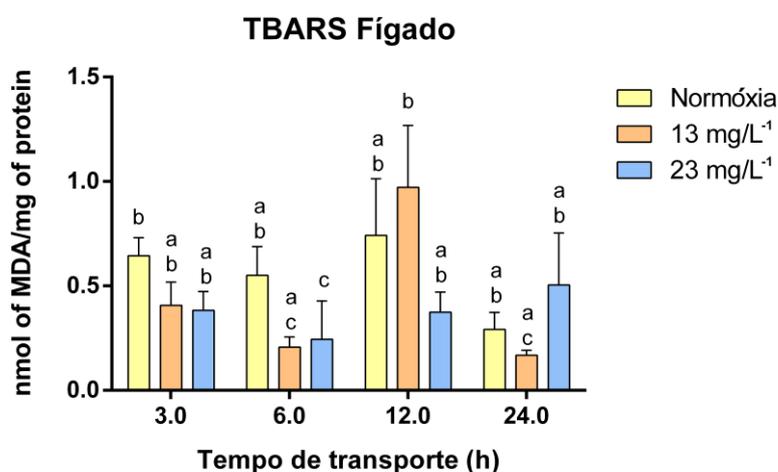


Figura 16- Concentração de MDA no fígado de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de O<sub>2</sub>. Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls ( $P < 0.05$ ).

Todavia, no músculo a concentração de TBARS foi consideravelmente menor em 12 h de transporte ( $P < 0.05$ ) nos peixes submetidos à HS quando comparado ao grupo normóxia no mesmo tempo. E, nos demais tempos de transporte e respectivas concentrações de oxigênio testado não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0.05$ ) (Figura 17).

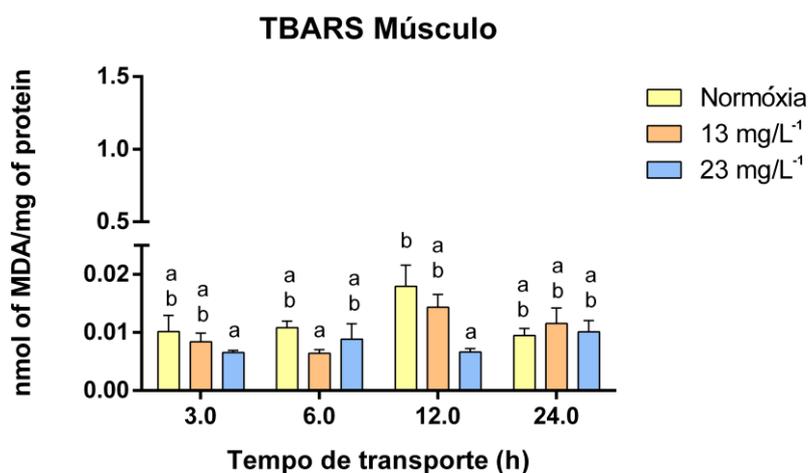


Figura 17- Concentração de MDA no músculo de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de O<sub>2</sub>. Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls ( $P < 0.05$ ).

Nas brânquias não foram verificadas diferenças significativas no conteúdo de TBARS entre as diferentes concentrações de O<sub>2</sub> testadas ao longo dos tempos de transporte ( $P > 0.05$ ) (Figura 18).

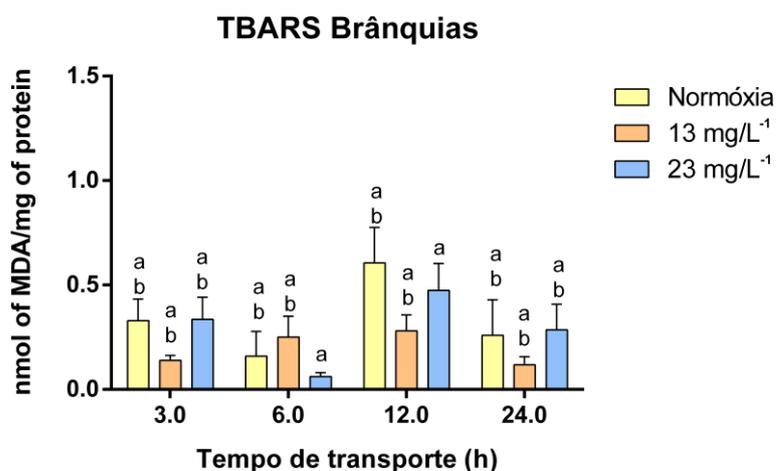


Figura 18- Concentração de MDA em brânquias de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de O<sub>2</sub>. Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls ( $P < 0.05$ ).

No cérebro não foram observadas alterações significativas ( $P > 0,05$ ) nos níveis de peroxidação lipídica independentemente dos níveis de OD iniciais nos sacos ou do tempo de transporte, mantendo-se semelhantes entre si em todas as situações impostas (Figura 19).

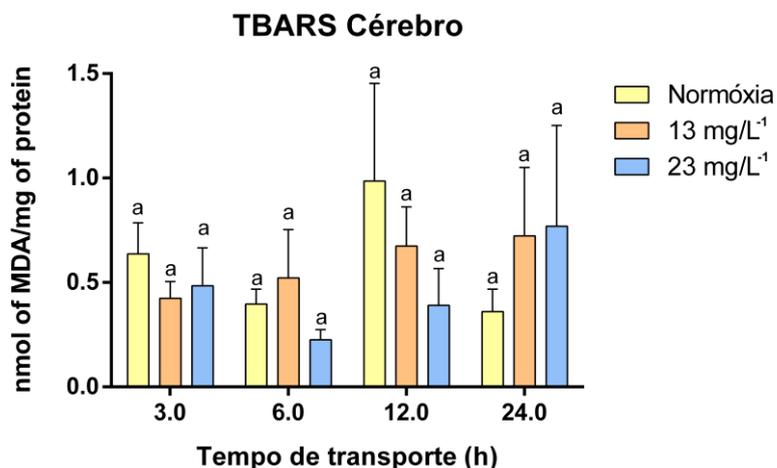


Figura 19- Concentração de MDA no cérebro de *P. oligospila* transportados em diferentes tempos e concentrações iniciais de O<sub>2</sub>. Tratamentos seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newmann-Keuls ( $P < 0.05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A maioria dos parâmetros de qualidade de água monitorada não sofreu alterações significativas em função dos tempos de transporte ou das condições iniciais de oxigenação da água. Outros estudos relativos a transporte de peixes também relatam situação similar à alcalinidade, dureza, pH e temperatura (Carneiro *et al.*, 2009; Zeppenfeld *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2015). As exceções foram às concentrações de OD, que ao final do transporte correspondiam de forma coerente às concentrações padronizadas no início das embalagens.

Mesmo não determinando o consumo de oxigênio, aparentemente este se manteve em taxas mínimas ao decorrer dos tempos de transporte, independente dos tratamentos de OD. De acordo com Wedemeyer (1996), em condições hiperóxicas os peixes reduzem a ventilação normal nas brânquias e diminuem o débito cardíaco, sofrendo com a elevação acentuada de CO<sub>2</sub> no sangue arterial em função do aumento da produção metabólica desta forma de carbono inorgânico. Para compensar a hipercapnia o sistema de tamponamento do sangue aumenta a concentração de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

no plasma. Em situação inversa, isto é, em baixas concentrações de O<sub>2</sub> os peixes também reduzem o consumo deste gás aumentando também a produção de CO<sub>2</sub>, recorrendo a mecanismos adaptativos, como por exemplo, depressão metabólica (metabolismo anaeróbico). E, quando o organismo não consegue reverter este quadro, pode ser levado a morte por asfixia (Kutty, 1987). No entanto, no presente trabalho não foram detectadas mortalidades.

Segundo Fivelstad *et al.* (2003) o oxigênio supersaturado, a limitada renovação de água e elevadas densidades favorecem o acúmulo de CO<sub>2</sub>, o qual reage com a água promovendo a redução do pH. Portanto, altas concentrações de CO<sub>2</sub> podem ter efeito direto e indireto sobre a fisiologia dos peixes, já que interage com o sistema tampão de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e afetando o pH (equilíbrio ácido-base) sanguíneo, bem como o equilíbrio hidromineral. Comparando com a concentração segura de 1-10 mg/L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> livre recomendada pela literatura para sistemas de produção (Sá, 2012), a quantidade de CO<sub>2</sub> estimada na água de transporte do presente estudo pode ser considerada absurdamente elevada.

O aumento da amônia na água de transporte decorre principalmente do metabolismo dos peixes e da ação bacteriana sobre resíduos excretados pelos animais na água (Berka, 1986; Ip *et al.*, 2001). Neste meio, a amônia está presente na forma ionizada (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou íon amônio) e não ionizada (N-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) e, quando somadas constituem a amônia total (Baldisserotto, 2013). A amônia N-NH<sub>3</sub> é considerada a mais tóxica em função de sua natureza lipofílica, que lhe permite permear através das membranas biológicas com mais facilidade (Ip *et al.*, 2001; Randall; Tsui, 2002; Ip; Chew, 2010;).

Sabe-se que a toxicidade da amônia é influenciada diretamente pelo pH da água e em menor proporção pela temperatura e salinidade (Sá, 2012; Baldisserotto, 2013). No presente estudo, ao final de todos os tempos de transporte, o pH manteve-se ácido em quaisquer dos tratamentos de OD e, por isso, o acúmulo de N-NH<sub>3</sub> foi mínimo em todas as situações testadas, não oferecendo riscos aos peixes já que o valor letal de amônia tóxica é 0,20 mg/L<sup>-1</sup> (Moro *et al.*, 2013). Mas, ao contrário da amônia não ionizada, a TAN se acumulou significativamente nos grupos sob normóxia em 12 e 24 h. Isto porque, quando o pH é ácido ocorre um descolamento do equilíbrio das formas de amônia no sentido de produzir íons hidroxilas e, combinada a excreção de compostos

nitrogenados ao longo do tempo, a concentração da forma ionizada e atóxica  $\text{NH}_4^+$  se elevou (Sá, 2012).

Entretanto, em ambos os tratamentos hiperóxicos mesmo sob pH ácido e temperatura inalterada, a TAN manteve-se em menores concentrações quando comparados ao grupo normóxia. A literatura explica que o oxigênio pode participar de processos biológicos que promovem a oxidação da amônia. Contudo este mecanismo está bem descrito para o processo de nitrificação em sistemas de produção viabilizado por bactérias nitrificantes que oxidam amônia a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e por fim a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Sá, 2012).

A soma de todos os fatores discutidos acima não afetou os parâmetros de respostas secundárias de estresse após transporte. Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004), afirmam que os níveis de glicose sanguínea estão intrinsecamente ligados ao modo de vida e atividade metabólica, sendo que peixes mais ativos geralmente apresentam maiores níveis de glicose. Neste trabalho, o acari bola apresentou baixos níveis de glicemia, mantendo-se inalterada antes e ao longo do transporte, sugerindo baixa atividade metabólica. Neves (2011) caracterizando parâmetros hematológicos de diferentes acaris, registraram menor glicemia para esta mesma espécie ( $50,28 \pm 8,8 \text{ mg/L}^{-1}$ ) comparada com acari pleco (*Cochilodon* sp.) ( $64,17 \pm 26,9 \text{ mg/L}^{-1}$ ). A osmolalidade plasmática, indicador de distúrbio osmorregulatório, não apresentou diferenças significativas durante os tempos de transporte. De modo similar, a perca europeia (*Perca fluviatilis*), L., não apresentou diferenças significativas na osmolalidade ao final de 4 h de transporte (Acerete *et al.*, 2004).

Sabe-se que a hiperóxia estimula a geração de ROS (Lushchak; Bagnyukova, 2006), a qual quando em excesso sobrecarrega a capacidade antioxidante dos organismos, prejudicando seu sistema de defesa antioxidante e favorecendo danos oxidativos em moléculas (Jones, 2006; Sies, 1993). A maioria das publicações que investigam o estresse oxidativo em organismos aquáticos se concentra nos efeitos de xenobióticos sobre atividade de enzimas antioxidantes e de danos oxidativos (Atli *et al.*, 2016; Qu *et al.*, 2014; Souid *et al.*, 2013; Trevisan *et al.*, 2014; Srikanth *et al.*, 2014) ou sobre os efeitos da hipóxia/anóxia e reoxigenação sobre o sistema de defesa antioxidante e mecanismos de adaptação metabólica (Li *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2016; Welker *et al.*, 2012; Filho *et al.*, 2005; Lushchack *et al.*, 2005b; Lushchack *et al.*, 2001)

e, em menor escala para as implicações de condições hiperóxicas sobre danos oxidativos e defesas antioxidantes em peixes (Lushchak; Bagnyukova, 2006), dificultando a comparação e discussão de resultados, ainda mais no caso de transporte envolvido. Apesar disso, já é bem conhecido que os organismos aquáticos fazem ajustes nas defesas antioxidantes para manter ROS em níveis controlados sob tal condição, assim como as espécies adaptadas a microambientes hiperóxicos (Welker *et al.*, 2013).

Em juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), por exemplo, após exposição à hiperóxia durante 4 h ( $> 40 \text{ mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$ ), observou-se elevações transitórias em antioxidantes nas brânquias e no fígado, além de uma redução nos marcadores de estresse oxidativo (Ritola, 2002). No fígado de *P. oligospila* a competência antioxidante foi menor no grupo HS do que nos peixes sob normóxia em 6 h de transporte, mas em 24 h a ACAP diminuiu neste último grupo. Já nas brânquias, a ACAP reduziu nos peixes sob HS após 6 h de transporte em comparação ao mesmo tratamento de OD em 3 h, assim como em 12 h, onde os animais diminuíram a ACAP inclusive quando comparados aos peixes sob normóxia e HM no mesmo tempo.

Por outro lado, o músculo dos acaris bola em normóxia apresentou oscilações na capacidade antioxidante, que em teoria pode ser atribuído aos ritmos circadianos, tendo em vista que *P. oligospila* é uma espécie demersal pacífica e, portanto, as variações na competência antioxidante provavelmente seguiram o ritmo de consumo de oxigênio e de atividade dos animais ao decorrer dos diferentes horários em que cada lote foi transportado, assim como observado previamente em espécies de peixes e caranguejos (Vatine *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2010, 2004). Contudo, observou-se também que em 24 h os animais em HS diminuíram sua competência antioxidante, quando comparado aos tempos de transporte anteriores para o mesmo tratamento de OD.

Em comparação aos tecidos discutidos anteriormente, o cérebro de *P. oligospila*, apresentou menor competência antioxidante em 3 h de transporte nos peixes sob normóxia. No cérebro de goldfish (*Carassius auratus*) expostos a hiperóxia (18-20 mg/L de  $\text{O}_2$ ) a glutathiona-S-transferase foi a única enzima que manteve atividade em níveis intermediários durante 3, 6 e 12 h, não diferindo do controle normóxia. Entretanto, aumentou cerca de 70% neste tecido em 36 h de recuperação (Lushchak *et al.*, 2005a).

Segundo Welker *et al.*, (2013) cada espécie de peixe desenvolve sua estratégia de adaptação a condições adversas. Alguns por exemplo, melhoram seu sistema de defesa antioxidante quando em condições hiperóxicas ou sob quaisquer condições que favoreçam a produção de ROS. Assim, de alguma maneira os acaris bola em normóxia aumentaram a ACAP no cérebro em 6 h de transporte e, do mesmo modo o fizeram no grupo sob normóxia em 24 h de transporte em comparação aos peixes em HS no mesmo período. Entretanto, não se descarta a possibilidade de tal resultado ser fruto do ritmo circadiano de *P. oligospila* (Vatine *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2010, 2004).

Os acaris bola apresentaram concentração de TBARS semelhante entre os seus tecidos, diferindo algumas vezes no tempo em que ocorreram os menores níveis de LPO. Lushchak *et al.* (2005a) observaram em *C. auratus* que o nível de lipoperoxidação (TBARS) aumentou no fígado e no músculo após 3 h de exposição a hiperóxia, mas nos demais tempos (6 e 12 h) o conteúdo de TBARS caiu em todos os órgãos (incluindo o rim e o cérebro) para níveis bem abaixo dos valores do controle, mantendo-se reduzido durante o período de recuperação. Segundo estes autores, a elevação da atividade da GST no fígado foi a possível responsável pela seguinte diminuição no conteúdo de TBARS neste tecido, embasando tal afirmação através de uma forte correlação negativa entre o nível de TBARS e atividade de GST no fígado, refletindo a importância desta enzima sobre a decomposição de resíduos aldeídicos da peroxidação lipídica.

O cérebro e fígado possuem elevado potencial para a produção de ROS, que parece ser eficientemente contrabalanceado por poderosos mecanismos de detoxificação e reparação de lipídeos e proteínas danificados (Lushchak; Bagnyukova, 2006). No fígado de *P. oligospila* as concentrações de TBARS diminuíram em 6 h de transporte nos peixes em HS quando comparado com aqueles em normóxia e, ainda apresentou menor conteúdo de TBARS quando comparado entre os diferentes tempos de transporte no mesmo tratamento de OD. Mas em HM após 12 h de transporte, o conteúdo de TBARS aumentou consideravelmente no mesmo tratamento de OD em relação a 6 e 24 h de transporte.

De modo semelhante, no músculo o conteúdo de TBARS também foi menor nos peixes sob HS, porém este evento ocorreu apenas em 12 h de transporte. Interessantemente, nas brânquias o nível de LPO também foi menor no grupo HS em 6 h, apesar de não detectadas diferenças significativas entre este e os demais grupos. Por

fim, o cérebro apresentou baixos conteúdos de TBARS que não se alteraram no decorrer dos tempos avaliados.

De acordo com Lushchak *et al.* (2005a), a supressão de produtos oriundos do dano oxidativo lipídico é uma das mais rápidas respostas a condições hiperóxicas, podendo ser resultado de um rápido aumento na regulação de uma ou mais defesas antioxidantes, o que coincide com os resultados observados para acaris bola. Neste sentido, em *P. oligospila* os tecidos que apresentaram maior competência antioxidante em todos os tempos de transporte foram as brânquias e o músculo, tanto em normóxia quanto em ambas as condições hiperóxicas. E, não por acaso, também observou-se menor conteúdo de TBARS nestes tecidos em contraste ao verificado no cérebro e fígado.

Neste contexto, GST parece ser uma das principais enzimas antioxidantes envolvidas na resposta a condições hiperóxicas (Lushchak *et al.*, 2005a), já que catalisa conjugados de uma vasta variedade de compostos estranhos à glutathione, responsável pela detoxificação de xenobióticos e aldeídos produzidos via peroxidação lipídica (Huber *et al.*, 2008). Neste sentido, é provável que a GST tenha atuado convertendo produtos da LPO em espécies não tóxicas reduzindo a concentração de TBARS nos órgãos de *P. oligospila* (Hermes-Lima, 2004).

Por outro lado, o aumento da produção do radical  $O_2^{\cdot-}$  em função da hiperóxia (Turrens *et al.*, 1982) promove alterações marcantes na SOD (superóxido dismutase) (Finne *et al.*, 2008; Olsvik *et al.*, 2006; Ritola *et al.*, 2002; Lyggreen *et al.*, 2000), a qual é uma resposta adaptativa com papel de contrapesar o aumento da produção daquela espécie reativa nos seus sítios de formação (Marcon, 1996; Halliwell; Gutteridge, 2007; Halliwell; Gutteridge, 1989; Hermes-Lima, 2004). Marcon (1996) verificou elevada atividade SOD no fígado de tambaquis (*Colossoma macropomum*) aclimatados a hiperóxia (pressão parcial de  $O_2$   $348,00 \pm 12,07$  mmHg). Mas em acará-açu (*Astronotus ocellatus*) (pressão parcial de  $O_2$   $373,97 \pm 10,55$  mmHg) nenhuma resposta compensatória foi manifestada pela SOD.

Mesmo não quantificadas a atividade da SOD e GST, possivelmente um ou mais mecanismos de defesa antioxidante poderia estar sendo empregados pelos acaris bola sob transporte em ambas as condições hiperóxicas testadas. Ainda assim, prudência é

fundamental quanto a generalizações, pois as respostas de organismos de diferentes hábitos e habitats podem ser muito distintas quanto a sua natureza (Marcon, 1996).

Em suma, oscilações ocorreram na competência antioxidante de *P. oligospila*, em especial no tecido muscular, mas esta se mostrou suficiente para a manutenção dos níveis de lipoperoxidação de tecidos de brânquias, cérebro e músculo sem que ocorresse agravamento de dano lipídico em função do tempo de transporte ou do nível inicial de oxigênio utilizado. E, mesmo quando a lipoperoxidação parecia se intensificar, como no caso do fígado, apesar de ter sido de forma pontual, esses mecanismos antioxidantes foram eficazes para evitar dano lipídico significativo à medida que o transporte se prolongou.

É importante ressaltar que o transporte sob hiperóxia favoreceu a qualidade da água por atenuar o acúmulo de amônia. Uma vez que as concentrações hiperóxicas determinaram menores concentrações de TAN ao final do transporte mais longo (24 h), recomenda-se o uso de altas concentrações de oxigênio em transporte de longa duração para essa espécie. Mas, com base nos resultados obtidos para o grupo normóxia, pode-se sugerir o transporte de acari bola em água inicialmente em normóxia, sem adição de oxigênio puro nas embalagens por no máximo 24 h, levando em consideração que o pH deve ser mantido em níveis pouco abaixo da neutralidade.

## 7. CONCLUSÕES

Os parâmetros de qualidade da água como alcalinidade, dureza e temperatura não se alteraram nas diferentes concentrações de OD e nos tempos de transporte, assim como o pH. Em função deste último parâmetro, as concentrações de N-NH<sub>3</sub> foram mínimas, proporcionando baixa toxicidade aos peixes. Apesar de elevadas, as concentrações de CO<sub>2</sub> não provocaram mortalidades. As concentrações finais OD, foram coerentes com a adição inicial de oxigênio puro às embalagens. Em adição, a exposição a hiperóxia ao longo do tempo, não desencadeou perturbação nas respostas secundárias de estresse, ratificando a rusticidade de *P. oligospila* quando submetidos aos estressores aqui testados. Assim como, não implicaram, de modo geral, em estresse oxidativo nessa espécie, o que indica a presença de um sistema de defesa antioxidante eficiente no combate e eliminação de ROS.

## 8. PERSPECTIVAS

Futuras pesquisas devem ser realizadas com intuito averiguar a relação entre a disponibilidade OD e excreção de compostos nitrogenados. Considera-se também importante estudar os mecanismos de adaptação respiratória de *P. oligospila* à diferentes concentrações de oxigênio, isto porque no presente estudo estes animais pareceram controlar o consumo deste gás, já que as concentrações finais de OD na água permaneceram equiparadas ao longo de todos os tempos de transporte.

Além disso, também é necessário elucidar os mecanismos existentes por detrás do panorama global fornecido pela capacidade antioxidante total contra radicais peroxil, priorizando-se a determinação da atividade de enzimas como a GST e a SOD, as quais podem ter sofrido ajustes para suportarem a adaptação de *P. oligospila* às condições experimentais impostas. Não se esgotando as perspectivas, a quantificação de possíveis danos em proteínas é fundamental já que produtos da oxidação podem interagir com grupos sulfidrilas (-SH), por exemplo, favorecendo um ambiente redox pró-oxidante.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERETE, L.; BALASCHA, J. C.; ESPINOSAB, E.; JOSAB, A.; TORTA, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*. 237: 167 – 178.
- AMADO, L. L.; RAMOS, P. B.; FREITAS, R. F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J. L.; YUNES, J. S.; MONSERRAT, J. M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407: 2115 – 2123.
- AMADO, L. L.; GARCIA, M. L.; PEREIRA, T. C.; YUNES, J. S.; BOGO, M. B.; MONSERRAT, J. M. 2011. Chemoprotection of lipoic acid against microcystin-induced toxicosis in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C. 154: 146 – 153.
- ANDERSON, M. E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*. V.111/112: 1 – 14.
- ARMBRUSTER, J. W. 2008. The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*. 76: 34 – 37.
- ATLI, G.; CANLI, E. G.; EROGLU, A.; CANLI, M. 2016. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 126: 30 – 37.
- BALDISSEROTTO, B. 2013. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria, RS. 3º ed. Ed. UFSM. 352.
- BARBOSA, K. B.; COSTA, N. M.; ALFENAS, R. C.; DE PAULA, O. S.; MINIM, V. P.; BRESSAN, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. Campinas. 23: 629 – 643.
- BERKA, R. 1986. The transport of live fish: A review. EIFAC Tech. Pap. FAO Rome. 48: 52.

- BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 29: 113 – 123.
- BARTON, A. B.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1: 3 – 26.
- BRAUN, N.; LIMA, R. L.; FLORA, F. D.; LANG, M. E.; BAUERMANN, L.; LORO, V. L.; BALDISSEROTO, B. 2008. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in silver catfish (*Rhamdia Quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Ciência Animal Brasileira*. 9: 811 – 814.
- BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do brasil. Museu Nacional (eds). Rio de Janeiro. 195.
- CARNEIRO, P. C. F.; KAISELER, P. H. S.; SWAROFISKY, E. A. C.; BALDISSEROTTO, B. 2009. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. *Neotropical Ichthyology*. 7: 283 – 288.
- CHAO, N.L. 2001. Fisheries, diversity and conservação of ornamental fishes of the Rio Negro Basin, Brazil – a review of Projeto Piaba (1989 – 1999). In: Chao, N. L.; Petry, L.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Trusty, M. Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro Basin, Amazônia, Brazil – Projeto Piaba. Manaus : Editora da Universidade do Amazonas, 309.
- CHUAN, L.; DHERT, P.; SORGELOOS, P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research*. 34: 923 – 935.
- COMPORTI, M. 2010. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. *Journal of the Siena Academy of Sciences*. 2: 13 – 26.
- CONCEA. 2013. Diretrizes da prática de experimentação animal. Resolução Normativa nº 13, de 20 de Setembro de 2013. DOU nº 187–26/09/13 – seção 1 – p.5.
- DATTA, S. 2012. Management of water quality in intensive aquaculture. *Respiration*. 6: 17.

- DECKER, H.; VAN HOLDE, K. E. 2010. Oxygen and the evolution of life. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 169.
- DICKINSON, D.A., H.J. FORMAN. 2002. Cellular glutathione and cellular metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 64: 1019 – 1026.
- DI MASCIO, P.; MURPHY, M. E.; SIES, H. 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 53: 194 – 200.
- DOGAN, D.; CAN, C.; KOCYIGIT, A.; DIKILITAS, M.; TASKIN, A.; BILINC, H. 2011. Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*. 84: 39 – 46.
- EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; RICE, E. W.; GREENBERG, A. E. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. American Public Health Association, Springfield.
- ESPMARK, A. M.; HJELDE, K.; BAEVERFJORD, G. 2010. Development of gas bubble disease in juvenile Atlantic salmon exposed to water supersaturated with oxygen. *Aquaculture*. 306: 198 – 204.
- FAO. 2000. Responsible ornamental fisheries. Food and Agriculture Organization of the United Nations. BARTLEY, D. N° 24. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/005/x4933e/x4933e10.htm> >.
- FAO. 2007. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. N° 501. Rome. 628.
- FAO. 2012. The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 230.
- FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2014. Rome. 223.
- FENG, J.; YING, G.; GAO, Y.; ZHU, L. 2016. Effects of hypoxia on the physiology of zebrafish (*Danio rerio*): initial responses, acclimation and recovery. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 96: 43 – 48.

- FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43: 6 – 8.
- FINNE, E.F.; OLSVIK, P.A.; BERNTSSEN, M.H.G.; HYLLAND, K.; TOLLEFSEN, K.E. 2008. The partial pressure of oxygen affects biomarkers of oxidative stress in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Journal of the European Society of Toxicology in Vitro*. 22: 1657 – 1661.
- FILHO, D. W.; TORRES, M. A.; FILHO, E. Z.; PEDROSA R. C. 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*. 244: 349 – 357.
- FISHBASE. 2015a. Lista de peixes de água doce do Brasil. Disponível em: <[http://www.fishbase.org/country/CountryChecklist.php?c\\_code=076&vhabitat=fresh&csub\\_code=>](http://www.fishbase.org/country/CountryChecklist.php?c_code=076&vhabitat=fresh&csub_code=>)>.
- FISHBASE. 2015b. *Peckoltia oligospila* (Günther, 1864). Disponível em: <<http://www.fishbase.se/summary/49963>>.
- FIVELSTAD, S.; OLSEN, A. B.; WÅGBØ, R.; ZEITZ, S.; HOSFELD, A. C. D.; STEFANSSON, S. 2003. A major water quality problem in smolt farms: Combined effects of carbon dioxide and reduced pH (Al) on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*. 215: 339 – 357.
- FOGAÇA, F.; SANT'ANA, L. S. 2009. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. *Archives of Veterinary Science*. 14: 117 – 127.
- FRIDOVICH. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*. Part 8. 201: 1203 – 1209.
- GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. F. 2011. Psychological stress and welfare in fish. *Annual Review of Biomedical Sciences*. 11: 1 – 20.
- GARCIA, L. O.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B. 2015. Net ion fluxes and ammonia excretion during transport of *Rhamdia quelen* juveniles. *Ciência Rural*. 45: 1854 – 1858.

- GIRDLER, A.; WELCOMME, R.; WELLBY, I. 2010. Fisheries management - A manual for still-water coarse fisheries. Wiley-Blackwell. 1 st ed. 398.
- GÜLÇİN, I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86: 345 – 391.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. 1986. Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends Biochemical Sciences*. 11: 372 – 375.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142: 231 – 255.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 2007. Free radicals in biology and medicine. *Oxford*. 4th ed.: Oxford University Press - xxxvi, 851.
- HERMES-LIMA, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: Free radicals and oxidizing agents in biology. Chapter 12. KB Storey (Ed.). Wiley Canada. 1: 319 – 368.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*. 31: 1170 – 1179.
- IBAMA. 2007. Peixes ornamentais de águas continentais – Estatística de exposição por espécie, AM. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-recursos-pesqueiros/estatistica-peixes-ornamentais>>.
- IBAMA. 2008. Diagnóstico Geral das Práticas de Controle Ligadas a Exploração, Captura, Comercialização, Exportação e Uso de Peixes para Fins Ornamentais e de Aquarofilia. Brasília. Agosto. 217.
- IP, Y. K.; CHEW, S. F.; RANDALL, D. J. 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. *Fish Physiology*. 20: 109 – 148.
- IP, Y. K.; CHEW, S. F. 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in Physiology*. 1: 1 – 20.
- JONES, D. P. 2006. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Research*. 9: 169 – 181.

- KING, H. R. 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania. *Journal of Veterinary Behavior*. 4: 163 – 168.
- KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences*. 1: 53 – 60.
- KUTTY, M. N. 1987. Transport of fish seed and brood fish – Chapter 4. In: FAO. ARAC/87/WP/13.
- LEMARIÉ, HOSFELD, C. D.; BREUIL, G.; FIVELSTAD, S. 2011. Effects of hyperoxic water conditions under different total gas pressures in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 318: 191 – 198.
- LI, Y.; WEI, L.; CAO, J.; QIU, L.; JIANG, X.; LI, P.; SONG, Q.; ZHOU, H.; HAN, Q.; DIAO, X. 2016. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*. 144, 234 – 240.
- LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacological Reviews*. 4: 118 – 126.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V.; HUSAKA, V. V.; LUZHNA, L. I.; LUSHCHAKA, O. V.; STOREY, K. B. 2005a. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 1670 – 1680.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. 2005b. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 1319 – 1330.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B. 144: 283 – 289.

- LUSHCHAK, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101: 13 – 30.
- LYGREN, B.; HAMRE, K.; WAAGBB, R. 2000. Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed three different levels of dietary vitamin E. *Research Aquaculture*. 31: 401 – 407.
- LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal*. 173: 502 – 511.
- MACIEL, F. E.; ROSA, C. E.; SANTOS, E. A.; MONSERRAT, J. M.; NERY, L. E. M. 2004. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Canadian Journal of Zoology*. 82: 1871 – 1877.
- MACIEL, F. E.; RAMOS, B. P.; GEIHS, M. A.; VARGAS, M. A.; CRUZ, B. P.; MEYER-ROCHOW, V. B.; VAKKURI, O.; ALLODI, S.; MONSERRAT, J. M.; NERY, L. E. M. 2010. Effects of melatonin in connection with the antioxidant defense system in the gills of the estuarine crab (*Neohelice granulata*). *General and Comparative Endocrinology*. 165: 229 – 236.
- MPA. 2011. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura. 60. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>.
- MPA. 2013. Balanço da pesca e aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura. 14. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>.
- MARCON, J. L. 1996. Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa. Tese de Doutorado. PPG-BTRN/INPA-UFAM, Manaus-AM. 132p.
- MARIANO, W. S.; OBA, E. T.; ASSIS, H. C. 2009. Biomarcadores de estresse oxidativo em peixes. In: NETO, A. S.; MARIANO, W. S.; SÓRIA, S. F. P. Tópicos Especiais em Saúde e Produção Animal. São Carlos: Pedro & João Editores. 81 – 106.
- MATÉS, J. M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 153: 83 – 104.

- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN. M. M., MOON, T. W. 1999. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biology and Fisheries*. 9: 211 – 268.
- MORO, G. V.; TORATI, L. S.; LUIZ, D. B.; MATOS, F. T. 2013. Monitoramento e manejo da qualidade da água em pisciculturas. In: *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Ed. RODRIGUES *et al.* Brasília, DF. Embrapa. 141 – 169.
- NBR 5761. 1984. Determination of hardness in water (complexometric method) - Method of tes. MB – 1067/1975. 1 – 3.
- NEVES, M. S. 2011. Hematologia como ferramenta no monitoramento do “status” da cadeia produtiva de oito espécies de acari ornamentais (Loricariidae) do Médio Rio Guamá, Estado do Pará. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Ambiental – PPBA da Universidade Federal do Pará, campus Bragança, 3 – 101.
- OAKES, K. D.; DER KRAAK, G. J. V. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluente. *Aquatic Toxicology*. 63: 447 – 463.
- OLSVIK, P. A; KRISTENSEN, T.; WAAGBØ, R.; TOLLEFSEN, K.-E.; ROSSELAND, BO; TOFTEN, H. 2006. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Biology*. 209: 2893 – 2901.
- ONU. 2014. Brazil: ornamental fish, live, export value. Commodity Trade Statistics. United Nations Statistics Division (UN data). Disponível em: <<http://data.un.org/Default.aspx>>.
- OSTRENSKY, A, MA MARCHIORI & LH POERSCH. 1992. Toxicidade aguda da amônia no processo produtivo de pós-larvas de *Penaeus paulensis*, Perez-Farfante, 1967. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 64: 383 – 389.
- PACKER, L. 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 53: 1050 – 1055.

- PATERSON B. D.; RIMMER M. A.; MEIKLE G. M., SEMMENS G. L. 2003. Physiological response of the Asian sea bass, *Lates calcarifer*, to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*. 218: 717 – 728.
- PICKERING, A. D. (Ed.). 1981. Stress and fish. London: Academic Press.
- QU, R.; WANG, X.; WANG, Z.; WEI, Z.; WANG, L. 2014. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*. 275: 89 – 98.
- RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*. 45: 17 – 23.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. 2004. Hematologia de Peixes Brasileiros. In: Sanidade de Organismos Aquáticos. RANZANI-PAIVA, M. J. Y.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. de los A. P. Editora Varela. São Paulo. 86 – 120.
- RIMMER M. A.; FRANKLIN, B. 1997. Development of live fish transport techniques. *Fisheries Research and Development Corporation*. QDPI. 1 – 151.
- RITOLA, O.; LIVINGSTONE, D. R.; PETERS, L. D.; LINDSTRÖM-SEPPA. 2002. Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture*. 210: 1 – 19.
- ROTTMANN, R. W.; FRANCIS-FLOYD, R.; DURBOROW, R. 1992. The Role of Stress in Fish Disease. *Southern Regional Aquaculture Center*. 474.
- SÁ, M. 2012. Limnocultura para aquicultura. Fortaleza. Edições UFC. 218.
- SAINT-PAUL, U. 1986. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: A review. *Aquaculture*. 54: 205 – 240.
- SIES, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215: 213 – 219.

- SRIKANTH, K.; AHMAD, I.; RAO, J. V.; TRINDADE, T.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E. Modulation of glutathione and its dependent enzymes in gill cells of *Anguilla anguilla* exposed to silica coated iron oxide nanoparticles with or without mercury co-exposure under in vitro condition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 162: 7 – 14.
- SOUID, G.; SOUAYED, N.; YAKTITI, F.; MAAROUFI, K. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 89: 1 – 7.
- THANNICKAL, V. J. 2009. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 40: 507 – 510.
- TIMMONS, M. B.; EBELING, J. M. 2010. Recirculating Aquaculture. 2nd edn. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, New York, 998 pp.
- TLUSTY, M.; DOWD, S.; WEBER, S.; COOPER, R. 2005. Shipping cardinal tetras from the Amazon-understanding stressors to decrease shipping mortality. *Ornamental Fish International*. 48: 21 – 23.
- TREVISAN, R.; FLESCH, S.; MATTOS, J. J.; MILANI, M. R.; BAINY, A. C. D.; DAFRE, A. L. 2014. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology*. Part C. 159: 22 – 30.
- TORRES, M. F. 2007. A pesca ornamental na bacia do rio Guamá: sustentabilidade e perspectivas ao manejo. Tese (Doutorado) – Núcleo de Altos Estudos Amazônicos - NAEA, Universidade Federal do Pará, Belém. 264.
- TURRENS J. F.; FREEMAN, B. A.; LEVITT, J. G.; CRAPO, J. D. 1982. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 217: 401 – 410.
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.

- URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 189: 41 – 54.
- VAL, A. L.; HONCZARYK, A. 1995. A criação de peixes na Amazônia: um futuro promissor. In: Criando peixes na Amazônia. (Eds VAL, A. L.; HONCZARYK, A.) Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA. Manaus – AM, Brasil. 1 – 5.
- VAL, A. L.; ROLIM, P. R.; RABELO, H. 2000. Situação atual da aquicultura no Norte. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. *Aquicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq. Ministério da Ciência e Tecnologia. 247.
- VATINE, G.; VALLONE, D.; GOTHILF, Y.; FOULKES, N. S. 2011. Zebrafish and the circadian clock. *FEBS letters*. 585: 1485 – 1494.
- VASCONCELOS, S. M.; GOULART, M. O.; MOURA, J. B.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 30: 1323 – 1338.
- VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*. 23: 274 – 279.
- VOGT, W. 1995. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology & Medicina*. 18: 93 – 105.
- WELKER, A. F.; CAMPOS, E. G.; CARDOSO, L. A.; HERMES-LIMA, M. 2012. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant Nile tilapia. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 302: 1111 – 1118.
- WELKER, A. F.; MOREIRA, D. C.; CAMPOS, E. G.; HERMES-LIMA, M. 2013. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 165: 384 – 404.

- WEDEMEYER, G. A. 1996. Physiology of Fish in Intensive Culture Systems. *Springer Science & Business Media*. 1st ed. 227.
- WENDELAAR-BONGA, S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77: 591 – 625.
- XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. 2011. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*. 409: 1444 – 1452.
- ZEHNDER, A. J.; SVENSSON, B. H. 1986. Life without oxygen: what can and what cannot? *Experientia*. 42: 1197 – 1205.
- ZEPPENFELD, C. C.; TONI, C.; BECKER, A. G.; MIRON, D. S.; PARODI, T. V.; HEINZMANN, B. M.; BARCELLOS, L. J. G.; KOAKOSKI, G. DA ROSA, J. G. S.; LORO, V. L.; DA CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture*. 418: 101 – 107.
- ZUANON, J. A.; SALARO, A. S.; FURUYA, W. M. 2011. Produção e nutrição de peixes ornamentais. *Revista Brasileira Zootecnia*. 40: 165 – 174.

## ANEXOS

Anexo I – Visão dorsal, lateral, ventral de *Peckoltia oligospila*, MCZ 62116, 136,1 milímetros SLR. Fotografado por J.W. Armbruster (2008).

