



Universidade Federal do Tocantins

PPGBec

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO

**Respostas fisiológicas em peixes neotropicais da espécie de Surubim pintado
Pseudoplatystoma corruscans (Spix e Agassiz, 1829), produzidas por mudanças no
nível de pressão sonora**

ANDREW JONATHAS DA SILVA MENESES

PORTO NACIONAL – TO

MARÇO/2020

Respostas fisiológicas em peixes neotropicais da espécie de Surubim pintado
Pseudoplatystoma corruscans (Spix e Agassiz, 1829), produzidas por mudanças no
nível de pressão sonora

ANDREW JONATHAS DA SILVA MENESES

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora, como exigência parcial para a obtenção de Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Tocantins Do Campus de Porto Nacional, sob a orientação do Prof. Dr. Thiago Nilton Alves Pereira e co-orientação da Prof^a. Dra. Carine Cavalcante Chamon.

PORTO NACIONAL – TO

MARÇO/2020

Andrew Jonathas da Silva Meneses

Respostas fisiológicas em peixes neotropicais da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829), produzido por mudanças no nível de pressão sonora.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ecologia e Conservação e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 20/02/2020

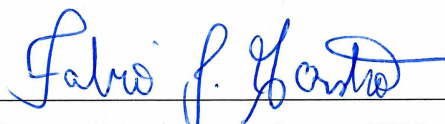
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Thiago Nilton Alves Pereira (Orientador), UFT



Prof. Dr. Mac David da Silva Pinto, UFT



Prof. Dr. Fábio de Jesus Castro, UFT

Porto Nacional - TO, 2020

DEDICATÓRIA

Dedico a minha querida mãe e Dra. Maria Ecilene Nunes da Silva Meneses por todo amor e compromisso dado para minha formação como homem e cientista. Dedico também a minha avó e ao meu avô, Maria Neusa Nunes e Raimundo Tavares por toda minha criação nessa vida humana, dedico a toda minha família e amigos que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus, por tudo que me deu em toda essa longa caminhada até aqui e por tudo que me deixara realizar em minha vida. A toda minha família pelo carinho, confiança e alegria que depositaram em mim para conseguir mais essa conquista, agradeço muita a minha mãe e Dra. Maria Ecilene Nunes da Silva Meneses, por ter me dado tudo que precisei para concluir essa pesquisa de mestrado, e principalmente pelo exemplo nessa carreira de pesquisador, te assistindo aprendi a gostar e hoje vou seguir pesquisando. Fico grato também a Universidade Federal do Tocantins (UFT) por ter me acolhido e pela oportunidade de estudar em uma ótima faculdade com excelentes professores, aos quais quero agradecer por todo conhecimento passado através das disciplinas e conversas amigáveis que tivemos. Deixo meu carinho a todos meus colegas da turma 2018.1, e a todos os professores do PPGBEC que contribuíram muito nessa estrada acadêmica, aqui quero agradecer a Isabel Técnica do Laboratório de Bioquímica e a Dra. Carla Seibert e sua orientada Juliane Monteiro pelo material e disponibilidade do laboratório, assim como ao Dr. Hollys Gomes Barreto e ao mestrando Matheus, pelo suporte no laboratório (LAM), vinculado ao Curso de Medicina da UFT de Palmas. Quero agradecer ao meu Orientador Dr. Thiago Nilton Alves Pereira e minha coorientada Dra. Carine Cavalcante Chamon, por toda a paciência, confiança e motivação para realização desse projeto, também pelas boas conversas, bons conselhos e pelos momentos bons, também gostaria de lembrar do Dr. Elton Carvalho de Lima, agradeço muito pelo apoio nas pesquisas desde a graduação até o mestrado. Expresso aqui, meu total agradecimento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela atribuição da bolsa de mestrado durante o curso no PPGBEC.

Essa pesquisa foi apresentada na 5ª conferência internacional “The Effects of Noise on Aquatic Life” realizada na Holanda na cidade de Den Haag, em julho de 2019, ao qual aqui reafirmo minha gratidão por ter participado desse grande evento com o apoio das agências e instituições abaixo. Obrigado a toda equipe de pesquisa do Neamb e da Fapto que auxiliaram na realização das gravações na usina e principalmente ao projeto P&D: Monitoramento do mecanismo de transposição de peixes na barragem da Usina do Lajeado: atratividade da escada para peixes como alternativa para redução do adensamento à jusante (Resolução 504/2012-P&D ANNEL), e Também a Fundação de Apoio Científico e Tecnológico do Tocantins (FAPTO).

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E METÓDOS.....	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Aclimatação e manutenção dos espécimes.....	18
3.3. Manuseio padrão I	19
3.4. Fase de controle.....	21
3.5. Fases de exposição sonora contínua e alternada.....	22
3.6. Análises sonoras.....	22
3.7. Manuseio padrão II (extração e análise sanguínea)	24
3.8. Análises estatísticas.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Perfis acústicos.....	28
4.2. Estresse fisiológico.....	31
4.3. Considerações finais.....	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXO A.....	40
ANEXO B.	51

Resumo

Nos últimos anos em oceanos e rios, houve um aumento na atividade humana que mudou a paisagem sonora do ambiente aquático. Estudos estão focados em investigar os efeitos desses agentes na vida animal subaquática, conhecimento ampliado para animais terrestres, mamíferos e mais recentemente, para peixes de água salgada e doce. Tanto em peixes quanto em outros vertebrados, existem estudos que se concentram na vocalização, porém ainda há poucas pesquisas que investigam os efeitos físicos e comportamentais em peixes e pouco se sabe sobre os efeitos em peixes neotropicais, o que motiva a expansão da área acústica subaquática na investigação de seus efeitos na ictiofauna brasileira. Nossa proposta foi avaliar as respostas fisiológicas ao estresse induzido por peixes jovens em laboratório, usando parâmetros sanguíneos como nível de cortisol e glicose encontrados nos momentos após o manuseio padrão com uma etapa sem controle experimental e outros com ruídos sonoros de frequência característica de 1kHz, usando uma caixa de som JBS via bluetooth conectada a um celular Android (Samsung J2). Os peixes foram isolados primeiro por duas horas depois por mais uma hora, o que nos permitiu o mesmo manuseio para todos e a resposta fisiológica obtida na condição criada, juntamente com o extrato de sangue. Observou-se o estresse gerado na curta exposição ao ruído contínua e alternada, utilizando a espécie *Pseudoplatystoma corruscans*, nos testes com 10 minutos de exposição contínua a exposição sonora e 30 min com sons alternados em dois e três minutos de exposição. Ambos apresentaram aumento da glicose ($P=0.014$), indicando estresse fisiológico na espécie, porém o cortisol não apresentou significância para esses tratamentos.

Palavras chave: Estresse fisiológico; Pressão sonora; Peixe neotropical

Abstract

In recent years in oceans and rivers, there has been an increase in human activity that has changed the sound landscape of the aquatic environment. Studies are focused on investigating the effects of these agents on underwater animal life, expanded knowledge for terrestrial animals, mammals and more recently for fish of salt and fresh water. Both in fish and other vertebrates, there are studies that focus on vocalization, but there is still little research that investigates the physical and behavioral effects in fish and little is known about the effects in neotropical fish, which motivates the expansion of the underwater acoustic area in the investigation of its effects on the Brazilian ichthyofauna. Our proposal was to evaluate the physiological responses to stress induced by young fish in the laboratory, using blood parameters such as cortisol and glucose levels found in the moments after the standard handling with a step without experimental control and others with noise sounds with a characteristic frequency of 1kHz, using a JBS speaker via bluetooth connected to an Android phone (Sumsung J2). The fish were isolated first for two hours later for another hour, which allowed us the same handling for everyone and the physiological response obtained in the created condition, together with the blood extract. It was observed the stress generated in the short exposure to continuous and alternate noise, using the species *Pseudoplatystoma corruscans*, in the tests with 10 minutes of continuous exposure to sound exposure and 30 min with alternating sounds in two and three minutes of exposure. Both showed increased glucose ($P = 0.014$), indicating stress on species, but cortisol was not significant for these treatments.

Key words: Physiological stress; Sound pressure; Neotropical fish.

1. INTRODUÇÃO

O planeta é cheio de sons com diferentes fontes, sendo elas de seres animados ou entidades inanimadas; nesse contexto, no ambiente aquático os peixes utilizam a audição para receber sinais. O som no ambiente aquático é cinco vezes mais rápido do que no ar atmosférico, devido a densidade maior do meio, sendo um dos elementos de estudo com grande influência no comportamento desses animais, pois é um estímulo de variável independente da luz, da temperatura, da turbidez e do fluxo da água (Hawkins e Myrberg, 1983; Popper e Carlson, 1998; Slabbekoorn e Popper, 2010). Mais características físicas da repercussão sonora no ambiente aquático em conjunto aos estímulos ambientais foram alvos de investigações na década de 70, relacionando efeitos fisiológicos em peixes (Popper e Fay, 1973).

As primeiras preocupações sobre o comportamento animal em referências ao ruído antropogênico surgiram de estudos com populações de aves devido a urbanização nas cidades (Slabbekoorn e Peet, 2003; Slabbekoorn e Ripmeester, 2008; Ortiz, 2011). Já em meio aquático alguns fatores estruturais são considerados grandes fontes de ruídos antropogênicos nos litorais, tais como, embarcações de grande porte, cravação de estacas e plataformas petrolíferas, (Simpson e Radford, 2016), e em rios, os grandes produtores de ruídos e de impactos tem sido as usinas hidrelétricas (Agostinho e Pelicice, 2007). Dessa maneira, muitas estruturas são capazes de mascarar a comunicação e retardar a atenção dos peixes. Em um estudo recente foi indicado um grande aumento na produção sonora subaquática continental, oriundas de explosões aquáticas, levantamentos sísmicos, perfurações, empilhamento de matérias de ferro e explorações de sonares entre outras ações que ameaçam a vida dos animais aquáticos (Popper e Hawkins, 2012).

Em peixes que vivem em recifes de corais, os ruídos têm demonstrado efeito negativo em longo prazo (Nedelec *et al.*, 2016). Os ruídos antropogênicos também afetam negativamente invertebrados (Nedelec e Radford *et al.*, 2014) como algumas espécies de crustáceos (Filiciotto *et al.*, 2016; Celi *et al.*, 2013). Em vertebrados, alguns cetáceos, como as baleias azuis, por exemplo, geralmente necessitam do som para comunicação entre si e para receberem respostas do ambiente (Tyack e Miller, 2002), alguns estudos apontam esses animais como modelo de grande potencial para o entendimento sobre os impactos do ruído antropogênico na vida aquática (Colpaert *et al.*, 2016). Outros animais, tais como os elefantes e as baleias (misticetes) utilizam de

infrassons para sua vocalização (Narins *et al.*, 2016), bem como em morcegos e algumas baleias (odontocetes) utilizam ultrassons para ecolocalização (Akamatsu *et al.*, 2005). Essas e outras comparações entre a produção e recepção acústica de animais aquáticos e terrestres são bem detalhadas por Ladich e Winkler (2017).

Quase todos os vertebrados precisam da audição como órgão de percepção no meio terrestre ou aquático. Nas profundezas dos oceanos, existem peixes que possuem uma boa recepção sonora devido à pouca intensidade da luz, assim a capacidade auditiva tem se mostrado mais sensível e eficaz, onde o som atravessa sem maiores barreiras as zonas fóticas e olfativas do vasto ambiente aquático, ressaltando-se sobre os outros sentidos dos animais (Deng e Wagner, 2013). Algumas espécies de peixes possuem capacidade tanto de criar sons quanto de detectá-los no meio, de acordo com a revisão de Ladich (2014) que cita órgãos produtores e receptores de sons nos peixes ósseos. Mesmo que nos peixes não exista órgão principal de vocalização, como a laringe nos répteis e mamíferos e a siringe nas aves; os peixes podem produzir som através do movimento das nadadeiras, em geral, dos músculos de movimento e algumas espécies possuem nadadeiras peitorais especializadas (Bradbury e Vehrencamp, 2011; Ladich e Popper, 2004; Ladich, 2014) e em alguns cavalos marinhos e bagres, por exemplo, exibem sistemas de detecção sonora na cabeça (Ladich e Bass, 2011). Além disso, é conhecido que os sons produzidos e sua recepção nos peixes são mascarados por atividades com ruído humano, causando efeitos negativos na predação e na busca por parceiros e ainda é conhecido que a evolução das estruturas de comunicação entre os peixes ocorreu primeiramente e principalmente em ambientes calmos (Vasconcelos *et al.* 2007; Codarin *et al.* 2009).

No início do século XX, surgiram as primeiras preocupações para influências que o som antropogênico pode causar sobre as populações de peixes (Parker, 1903), e a partir desta iniciativa, muitas técnicas foram desenvolvidas para mensurar as sensibilidades dos peixes ao som, como a que resultou em audiogramas de sensibilidade das frequências (Fay, 1988), a maioria das técnicas bem sucedidas em mensurar a sensibilidade auditiva dos peixes utilizam respostas do tronco cerebral (Kenyon *et al.* 1998; Ladich e Fay, 2013). Porém, na pesquisa proposta, serão utilizadas as respostas fisiológicas secundárias ao estresse que abrangem a concentração elevada de cortisol, glicose, hemoglobina e hematócrito no sangue. Outro parâmetro que é usado como indicador primário de estresse é a adrenalina e noradrenalina (David e James, 2005). Segundo Wysocki *et al.* (2006) gravações de ruído de barcos influenciam um aumento

na secreção de cortisol em duas espécies de peixes de Cypriniformes, *Gobiogobio* (Linnaeus, 1758) e o *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), e uma terceira espécie da ordem Perciformes chamada de *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758) sendo todos europeus de água doce e mantidos em laboratório, e mesmo tendo uma metodologia diferente (técnica não-invasiva), sendo aplicada para mensurar o estresse fisiológico, na pesquisa proposta, utilizaremos os mesmos princípios experimentais.

Naturalmente, todos os peixes são sensíveis ao som e são filogeneticamente basais em relação aos seres humanos; os peixes foram os primeiros vertebrados a possuírem o sistema de linha lateral, que provavelmente, originou o ouvido interno nos peixes ágnatos primitivos, onde algumas células ciliadas e órgãos Neuromastos da linha lateral presentes na cabeça dos indivíduos primitivos migraram da parte externa do animal para uma região mais interna; o ouvido interno nos peixes ósseos, bem como nos demais vertebrados derivados possui duas funções distintas: a primeira de equilíbrio localizada na região dorsal com três canais semicirculares contendo a endolinfa (líquido presente no ouvido interno dos vertebrados que auxilia no equilíbrio e na orientação gravitacional estando presente também na região do labirinto) e o utrículo, enquanto que os peixes sem mandíbulas possuem apenas um ou dois canais semicirculares; a segunda função de audição, localizando-se na região ventral do ouvido interno dos peixes mandíbulados e nos Osteichthyes existe o Sáculo e Lagenas com Otólitos como órgãos finais de audição, mesmo que algumas pesquisas demonstrem que o Utrículo possa vir a ser considerado o órgão final de audição em alguns Siluriformes.

Nos peixes ósseos, os Otólitos existem como estruturas denominadas máculas com células ciliadas chamadas de esteriocílios e cinocílios, os órgãos neuromastos são estruturas com essas células ciliadas citadas acima; estão presentes no canal da linha lateral dos peixes. Essa linha lateral foi a primeira estrutura auditiva a surgir nesses animais e esse canal é uma passagem formada pelos poros da epiderme na lateral do peixe, estende-se até a região da cabeça onde se ramifica formando orbitais. Assim é possível a entrada de água no canal e a detecção de ondas mecânicas e mudanças na pressão aquática pelas células ciliadas (Bleckmann, 1986; Pough e Janis, 2008; Popper e Schilt, 2008; Ladich e Winkler, 2017).

As mesmas células ciliadas e vestigiais das estruturas otólicas são encontradas no ouvido dos humanos; os esteriocílios e cinocílios dos répteis, aves e mamíferos estão presentes em um órgão final de audição, no órgão da Corti, na Cóclea ou labirinto; já em anamniotas não apresentam órgão final auditivo, sendo que nos peixes encontra-se

o utrículo, sáculo e o otólito e nos anfíbios a membrana anfíbia e a basilar como estruturas finais de audição. Contudo, na maioria dos vertebrados, as células ciliadas possuem a mesma função, de transformar as ondas mecânicas em impulsos elétricos para serem levadas ao sistema nervoso e serem codificadas pelo Sistema Nervoso Central, sendo que em termos filogenéticos essas estruturas são homólogas (Aires, 2012; Ladich e Winkler, 2017). Outros detalhes sobre a evolução do ouvido interno nos peixes são apresentados em estudos revisionais que detalharam minuciosamente a morfologia em algumas espécies de peixes analisando cada estrutura com sua possível função auditiva (Mirbach e Ladich, 2016) e mais comparações dos ouvidos internos entre os vertebrados são tratadas em Hildebrand e Goslow (2006) e em Ladich e Winkler (2017).

Os representantes da série Otophysi são especialistas em audição e possuem uma sensibilidade maior ao som do que peixes generalistas em audição (Kenyon et al. 1998). As espécies de Otophysi possuem o Aparelho Weberiano, conjunto de ossos modificados que ligam a bexiga natatória ao crânio do animal apresentando as quatro primeiras vértebras modificadas e fusionadas uma na outra, sendo denominadas de *Tripus*, *Intercalarium*, *Scaphium* e *Claustrum*; essas estruturas e o mecanismo foram descritos pela primeira vez por Weber (1820) (Figura 1), onde a onda mecânica atravessa a parede lateral do animal chegando a sua bexiga natatória (funcionando como uma caixa amplificadora do som) e esse sinal é transmitido pelos ossículos weberianos até o crânio e ouvido interno.

Tanto a forma e o grau de fusão dos ossos do Aparelho de Weber nos Otophysi, como a condição da bexiga natatória encapsulada ou não, a presença e ausência de algum osso orbital originado e ramificado do canal da linha lateral na cabeça dos peixes e o número de poros existentes em cada osso orbital são características sinapomórficas, ou seja, caracteres mais recentes que unem dois ou mais táxons em um grupo natural. Assim, no presente estudo trataremos o som como elemento de grande potencial causador de estresse para indivíduos especialistas, o que motiva novas investigações para esses grupos.

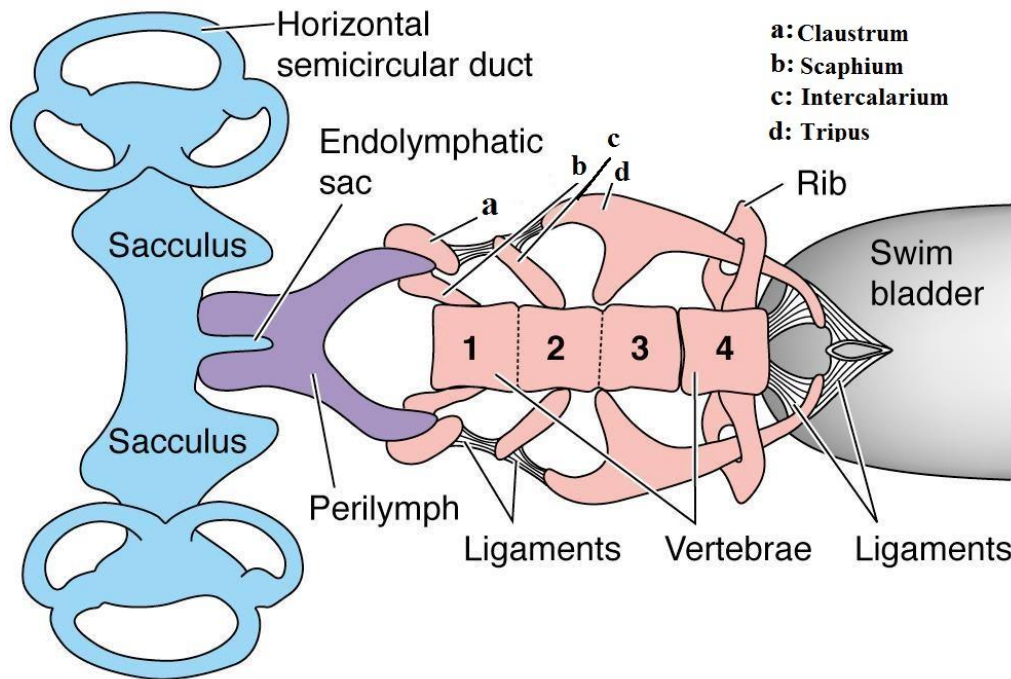


Figura 1: Imagem esquemática com modificações, das estruturas que formam o aparelho de Weber dos representantes de Otophysi (Fonte: <http://www.writeopinions.com/weberian-organ>).

Para os peixes, o estresse pode ocorrer tanto no meio natural como no experimental, sendo o estresse entendido como toda perturbação que ocorre ao animal, ocasionando desequilíbrio na sua homeostase, no qual, o indivíduo fica em estado de alerta. Diversos fatores podem provocar esse estado de alerta e desencadear o estresse em peixes, tais como: a presença de substâncias químicas poluidoras do meio, mudanças climáticas extremas do ambiente, oxigenação da água em níveis muito baixos, os hormônios sexuais, parasitismo entre muitos outros. Embora os peixes apresentem adaptações aos seus agentes estressores de maneira a superar as dificuldades impostas, tais fatores podem afetar negativamente na reprodução e crescimento (, Venderlaar Bonga, 1997; Schreck et al., 2001; Castro, 2006).

Quando existe algum desequilíbrio, ocorrem processos endócrinos respondendo ao estresse, essas respostas são denominadas de primárias, secundárias e terciárias (Mazeud et al., 1977; Wedemeyer e Mcleay, 1981). Existem dois eixos responsáveis pela produção dessas substâncias endócrinas, o eixo Hipotálamo Hipófise Interrenal (HHI) - responsável pela produção e liberação dos corticosteróides na corrente sanguínea e o eixo Hipotálamo Simpático Células Cromafins (HSC) - responsável pela produção e liberação das Catecolaminas (CAS). O tecido Interrenal nos peixes ósseos é homólogo ao tecido do córtex adrenal nos humanos, a função mineralocorticóide é feita

nos humanos pelo hormônio Adrenosterona, substância ausente nos teleósteos, sendo presente nos peixes pulmonados (dipnóicos) (Bonga, 1997; Schreck et al., 2001; David e James, 2005; Castro, 2006).

A primeira resposta neural começa quando o HSC é ativado, sendo a primeira resposta ao estresse. Na sua ativação ocorre a produção das substâncias CAS, onde são conhecidas como primárias a adrenalina e noradrenalina; nos humanos essas substâncias são produzidas na medula adrenal das glândulas Adrenais; já nos peixes ósseos são originadas a partir das Células Cromafíns, essas que são localizadas na região posterior das paredes das veias cardíais e nos rins cefálicos, fixadas através das fibras colinérgicas de nervos simpáticos. Essa produção de CAS é conhecida como ativação adrenérgicas e influencia imediatamente na aceleração do metabolismo do corpo, na circulação, na respiração (ventilação), aumento dos batimentos cardíacos, oxigenação sanguínea, e a concentração de hemoglobinas e eritrócitos por volume sanguíneo aumenta (Randall e Perry, 1992; Venderlaar Bonga, 1997; Castro, 2006). (Brade cardíaca)

O cortisol nos humanos é produzido na região do córtex das glândulas adrenais, com a adrenalina produzida na região medular dessa glândula. Juntas induzem a glicogenólise no metabolismo do indivíduo, onde ocorre à liberação de glicose pelo fígado levando a uma hiperglicemia. As CAS também atingem o balanço hidromineral, aumentando a permeabilidade das brânquias à água e aos íons, o que pode causar em peixes de água doce um influxo da água e um fluxo dos íons para o meio, ou seja, perdendo íons para o ambiente, porém o cortisol também restaura o equilíbrio iônico no animal (Zadunaisky, 1984; Mcdonald e Milligan, 1997; Castro, 2006). Já essas respostas secundárias são também chamadas de fisiológicas sendo concentrações de certas substâncias no sangue produzidas pelas glândulas endócrinas, como o hipotálamo, quando o eixo HHI é ativado, pela liberação do Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) liberado no sangue, a hipófise é uma glândula reguladora de hormônios no corpo e é regulado pelo hipotálamo, ocorrendo à detecção de alguma ameaça para o animal. O hipotálamo produz Corticotrófinas (CRF) que reagem as células corticotróficas da hipófise que começam sintetizar e liberar o ACTH no sangue. Com essa substância presente na circulação ocorre à síntese de corticosteroides, reagindo com as glândulas adrenais nos eixos HHI e HSC, nos peixes ósseos, o principal é o cortisol (Donaldson, 1981; David e James, 2005).

Assim o cortisol tem duas funções principais nos peixes ósseos, a primeira é de mineralocorticóide onde será responsável juntamente com as células cloretos presente nas brânquias pela osmorregulação. Nos peixes de água doce essas células se especializaram na retirada de íons do meio ambiente e quando são estressados perdem íons para o meio e a segunda função do cortisol é a de glicocorticóide que estimula a glicogenólise no fígado causando a hiperglicemia (David e James, 2005) e quando o peixe é estressado libera certa concentração de cortisol na água que podem ser medidas (Wysocki et al., 2006). Embora existam muitas pesquisas sobre o estresse fisiológico em peixes utilizando diversas técnicas experimentais, como eletrochoque e estressores sociais (peixe foco pareado a outro peixe maior dominante em um mesmo aquário/ambiente) (Barreto e Volpato, 2006), como parasitismo (Castro, 2006), sendo fontes primárias de estresse nos peixes. Pouco é investigado sobre tais respostas causadas por estressores sonoros.

Ainda segundo Barreto e Volpato (2006), algumas espécies de peixes como a Tilapía do Nilo (*Oreochromis niloticus*) possui em respostas diferentes ao estresse, produzido por distintos estressores. No entanto, no presente estudo tivemos como foco a investigação do estresse fisiológico causado apenas pela pressão sonora de 1 kHz com SPL de 118.1 dBs e com exposição experimental contínua e alternada. No Brasil, nos últimos anos, novas pesquisas estão em desenvolvimento com intuito de relacionar o efeito de gravações de ruído antropogênico produzido pelo funcionamento das turbinas de usinas hidrelétricas com respostas comportamentais em espécies neotropicais de Ostariophysi, focando na resposta comportamental dos peixes dentro de tanques, através de gravações de vídeos (Duarte et al., 2019). Em contraste, nossa pesquisa objetiva avaliar as respostas fisiológicas produzidas por exposição de sons artificiais em peixes, bem como acrescentar novas técnicas para área.

Dentro da ordem Siluriformes (Ostariophysi), foi observado que peixes com modificações de tamanho das bexigas natatórias e dos ossículos podem aumentar a capacidade auditiva em altas frequências, junto com o grau de fusão dos ossículos e do encapsulamento das bexigas. Tais estruturas modificam entre as espécies grandes e as pequenas, observado em indivíduos das famílias Loricariidae e Callichthyidae entre outras (Lechner e Ladich, 2008; Ladich, 2016). Em outro trabalho na área de audiogramas, foram apontados os limiares auditivos de 111 espécies de peixes de 51 famílias incluindo algumas espécies especialistas da superordem Ostariophysi, das ordens Characiformes e Siluriformes (Ladich e Fay, 2013).

O presente trabalho faz-se importante por ser um projeto piloto que visa a investigação do estresse gerado por pressão sonora em um representante da ordem Siluriformes, o *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829), conhecido popularmente como surubim ou pintado da bacia rio Araguaia-Tocantins, avaliando o estresse fisiológico através do nível de cortisol e glicose no sangue do animal, devido a mudança sonora do ambiente. Ainda com o propósito de impulsionar essa nova linha de pesquisa para o estado do Tocantins envolvendo a hidroacústica na vida da Ictiofauna brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um modelo experimental para avaliar as respostas fisiológicas na espécie de peixe neotropical *Pseudoplatystoma corruscans* mantido em cativeiro, quando expostos a mudanças na pressão sonora do ambiente.

2.2. Objetivos específicos

- * Determina níveis de indicadores de estresse: Cortisol e Glicose
- * Verificar se a espécie responde fisiologicamente ao aumento da pressão sonora
- * Criar o perfil acústico
- * Exposição contínua e alternada

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

A espécie utilizada na pesquisa foi a *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829), exemplar representado na parte superior da Figura 11, pertencente da família Pimelodidae, da ordem Siluriformes. O peso dos animais juvenis apresentou média de $13,7 \pm 4,00$ gramas e comprimento de $12,9 \pm 2,06$ centímetros.

São animais carnívoros, com hábitos noturnos e se alimentam de pequenos peixes e insetos, possuem um grande valor econômico, tendo sua carne sem espinhos é muito utilizado na culinária, presente em grande parte da América do Sul. Possuem barbilhões em sua cabeça como sensores, tem a pele revestida em couro e possuem machas escuras circulares por todo o corpo. Essa espécie tem indivíduos que podem medir até 180 centímetros na sua forma adulta, por essas razões tem sido alvo do mercado e da piscicultura, (Souza *et al.*, 1977; Lundstedt *et al.*, 2004). Como apontado por Godinho e colaboradores (2007), as espécies do gênero *Pseudoplatystoma* são animais migratórios e também vem sofrendo com os impactos de usinas hidrelétricas.

Todos os espécimes utilizados foram juvenis, provenientes de criadouro legalmente reconhecido e cadastrado junto aos órgãos de fiscalização estaduais. O tamanho dos animais foi estabelecido para evitar alterações fisiológicas que poderia vir a ocorrer no período reprodutivo de peixes migradores, bem como, levando em consideração o sucesso de extração de sangue através da punção intracardíaca em peixes desse porte. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFT), para formalizar nossa pesquisa e nos manter seguros e fiéis a todos os fins éticos necessários (Processo n°: 23.101.008614/2018-34). Os exemplares utilizados na pesquisa foram tombados na Coleção de Peixes da Universidade Federal do Tocantins como testemunhos da pesquisa.

3.2. Aclimação e manutenção dos espécimes

Trinta indivíduos foram transportados até o Laboratório de Sistemática do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação (PPGBEC) da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Porto Nacional, onde foram aclimatados durante quinze dias em um tanque. Os exemplares tiveram alimentação, temperatura e

luminosidade controladas para permitir o ajuste dos animais ao meio, segundo orientações do protocolo proposto por Barreto e Volpato (2006), essas são condições importantes para delinear esse tipo de pesquisa, o que pode vir variar entre cada experimento.

Os tanques possuíam a capacidade máxima de 310 litros (no entanto utilizou-se apenas 250 litros dessa capacidade total (Figura 2), foram posicionados ao lado do Laboratório de Biodiversidade em um ambiente sombreado, arejado e com claridade natural do dia. Os tanques experimentais foram montados 10 dias antes de receber os peixes do experimento de modo a criar um ambiente harmônico; assim foi montado um sistema de substituição (renovação) da água suja por uma nova e as trocas parciais de 30% de água diariamente seguiram o protocolo apresentado por Castro (2006) com as seguintes modificações: 1. O deslocamento de líquido foi realizado com o auxílio de mangueiras utilizando dos conceitos físicos no intuito de realizar as trocas de água; 2. Bombas submersas de filtragem (Marca Litwin BS 550/300) e bombas de oxigenação foram utilizadas no tanque; as bombas de oxigenação ficaram permanentemente ligadas durante todo o período experimental. Os peixes foram diariamente alimentados com ração com 26% proteína de carne. Os tanques experimentais foram suspensos do chão, para diminuir a interferência das vibrações transmitidas através solo, que podem ser gerados a partir do movimento de automóveis, pessoas, entre outros.

3.3. Manuseio padrão I

Os experimentos foram divididos em 02 (duas) fases:

Na fase 01, primeiramente descreveremos o manuseio padrão para todos os espécimes usados, cada espécime foi capturado por um puçá (acessório anexado ao balde) de maneira individual e mantido por duas horas dentro do tanque como mostrado na Figura 02.



Figura 2: Tanque de aclimação primaria dos peixes, com a utilização do puçá (seta amarela), com um indivíduo mantido por duas horas nesse primeiro isolamento (Fonte: Autor).

Para os indivíduos do tratamento 01, o experimento iniciou às 16:00 até às 18:00 horas, depois desse primeiro isolamento, cada peixe foi colocado em um balde de cor azul (área experimental) junto com o hidrofone e uma bomba de oxigênio. A área experimental tinha capacidade aproximadamente de 08 litros onde cada animal foi mantido por mais 01 hora nessa condição isolada em cima da bancada do laboratório, com um pano evitando contato com lado externo (Figura 3).



Figura 3: Segundo isolamento de uma hora dentro do balde, imediatamente após às duas horas do isolamento primário, como foi mostrado na figura anterior (Fonte: Autor).

Esse segundo isolamento foi realizado a uma temperatura ambiente controlada de 29 C°; tendo início sempre às 18:00 horas para o controle e às 20:00 horas para os tratamentos com exposição sonora. No presente estudo foram realizados três tratamentos, após as condições de manuseio padrão, no tratamento 01, depois de uma hora no balde os animais passaram mais 30 minutos isolado, nessa fase o aparelho sonoro não foi acionado; assim o animal foi transferido junto ao puçá para a solução anestésica para extração do sangue (punção sanguínea será descrita em tópico seguinte).

3.4. Fase de controle

Com a utilização do hidrofone foram realizadas gravações do som em ambiente de laboratório na área experimental, sendo o som de controle/nulo (o som nulo apresentado no presente estudo é referente ao sem exposição experimental e não ao natural produzido na natureza), assim poderemos comparar os resultados sanguíneos com a condição sonora imposta. A fase experimental de controle e a exposição sonora alternada também com duração de 30 minutos foram repetidas seis vezes (exceto nos valores do cortisol para o tratamento alternado, que tivemos duas amostras perdidas,

assim obtivemos quatro repetições), e o tratamento de exposição contínua teve três repetições, os peixes após as atividades de extração foram sacrificados e mantidos em formol para futuras avaliações osteológicas.

3.5. Fase de exposição sonora contínua e alternada

Nessa fase foram utilizados dois tratamentos de exposição sonora e a mesma metodologia de isolamento (manuseio padrão), ambos tiveram início do primeiro isolamento no tanque às 18 horas até as 20 horas, e em seguida foram para o segundo isolamento na bancada, no tratamento 02 com 30 minutos com a caixa de som ligada em uma frequência de 01 (um) kHz em volume específico, alternando de dois minutos com som ligado e três minutos desligado. Já no tratamento 03 os animais foram expostos por 10 minutos contínuos, porém em ambos os tratamentos, tiveram a mesma intensidade sonora exposta e iniciaram às 21 horas; os tratamentos 01 e 02 foram sempre realizados nos mesmos dias; já o tratamento 03 foi realizado nos dias subsequentes aos primeiros tratamentos.

3.6. Análises sonoras

As características sonoras foram selecionadas conforme a capacidade auditiva adequada para algumas espécies de peixes, como demonstrado por Ladich e Fay (2013) descrevendo audiogramas de espécies generalistas em audição e especialistas em audição. Sabendo que alguns peixes possuem sua comunicação acústica na banda de frequência em média de 1kHz (Lugli, 2015) e com base dessas informações observadas nos audiogramas, para alguns indivíduos de *Otophysi* (Figura 4), utilizamos essas características como estressores potenciais, sendo a frequência utilizada 1000 Hz com a intensidade mensurada em dB re 1 μ Pa (nível de pressão sonora dado em decibéis para medições subaquáticas), (Ladich e Fay, 2013).

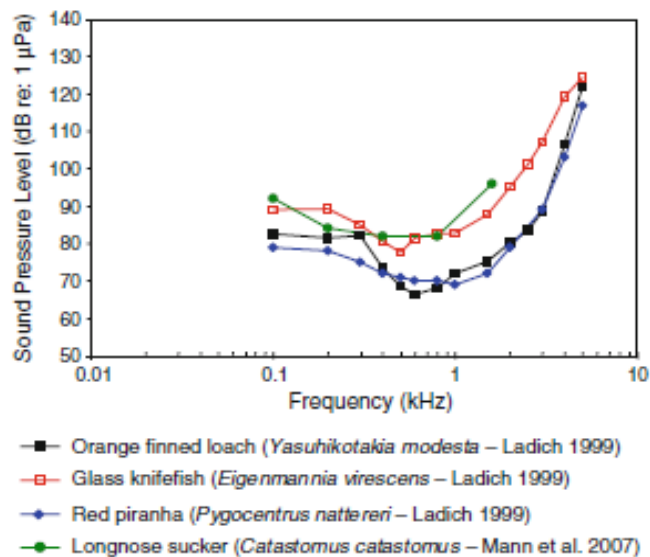


Figura 4: Audiograma feito para quatro espécies de peixes representantes de Otophysi (Fonte: Ladich e Fay, 2013)

As características da pressão sonora foram obtidas primeiramente pela geração dos ruídos através de uma caixa amplificadora (JBL) via sistema de Bluetooth conectado a um aparelho celular (Samsung J2), e o ruído exposto teve 01 (um) kHz de frequência, sendo baixado na internet gratuitamente, sendo um arquivo de som com extensão “wav” com duração de 1 minuto que foi modificado em um loop de 10 minutos, por um programa de tratamento sonoro denominado Audacity (Versão 2.3.3), para alcançar os objetivos previstos na pesquisa.

O ruído além de ser exposto aos peixes, foi capturado e gravado com o auxílio do hidrofone (Figura 5), equipamento que funciona a base de bateria de 12 volts, possui sensibilidade de 154 dBs em 16 Bits e grava e armazena os dados a cada dois minutos em um pen-drive em formato de “wav”, para mais detalhes desse aparelho veja; Caldas-Morgan, (2015). No qual através do programa R (Versão 3.0.1) e R studio (Versão 2.1.5033) foram obtidos os valores quantitativos desses dados, tanto da frequência quanto das intensidades em função do tempo, sendo analisados por espectrogramas adquiridos através da aplicação da transformada de Fourier nos áudios em “wav” e do SPL dado pela quantificação logarítmica dos dados em Pascal, respectivamente; utilizando um acompanhamento tutorial (Apêndice S1) com o pacote PAMguide (Dados S1) para o MATLAB e R (Merchant et al., 2015).



Figura 5: Hidrofone utilizado na pesquisa, mantado em um barco com a caixa gravadora no banco e ao seu lado a bateria de alimentação e ao canto da figura mostra a ponta receptora de áudio (Fonte: Autor).

3.7. Manuseio padrão II (Punção e análise sanguínea)

As técnicas para o manuseio dos peixes na hora de colocá-los em posição da punção do sangue seguiram a metodologia proposta por Ishikawa *et al.*, (2010), no intuito de minimizar e evitar alterações no estresse dos peixes de origem experimental como condições de cativeiro, manuseio dos espécimes, temperatura, pH da água, oxigênio, condutividade da água e salinidade (Campbell e Murru, 1990). Em todos os três tratamentos foram realizadas análises de condição da água com o auxílio de um medidor multiparâmetro (AK88), medição feita durante os sete minutos de anestesia (descrita no próximo parágrafo) foi feito os mesmos procedimentos para todos os indivíduos, assim como descrito na literatura especializada, assim as respostas ao estresse serão devidas exclusivamente da adição dos tratamentos sonoros.

Após o tempo experimental imposto nas etapas sonoras ou tempo de controle, cada espécime foi colocado junto com puçá em um recipiente com solução anestésica, utilizamos óleo de cravo (Eugenol 50 mg/L), (Figura 6A), foi preparado uma solução de dois litros; sendo observado os quatro estágios de anestesia completa em peixes do gênero *Pseudoplatystoma* (Vidal *et al.*, 2006). Após 07 minutos na solução anestésica;

02 minutos junto com o puçá dentro da bandeja com um pano preto como tampa (Figura 6B) adicionalmente 05 minutos dentro da bandeja sem o pano (Figura 6C).

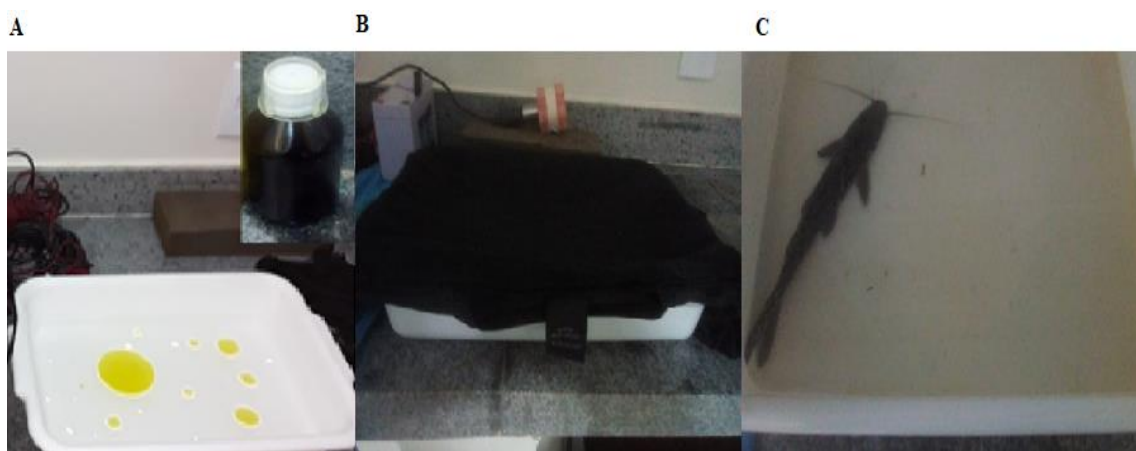


Figura 6: A. Anestésico colocado em 02 litros de água; B. pano preto como tampa da bandeja por dois minutos como citado no texto acima; C. bandeja descoberta por 05 minutos com um espécime dentro (Fonte: Autor).

Todos os peixes passaram pelo mesmo método de extração sanguínea por punção intra-cardíaca, usando uma seringa contendo EDTA, um anticoagulante universal, tivemos uma perfuração em cada indivíduo com duração de 01 minuto. Cada extração obteve aproximadamente de 0.500 a 02 ml (Figura 7B), o conteúdo foi transferido para tubos distintos onde foram devidamente identificados, colocados em um isopor com gelo e assim foram levados para análise no Laboratório de Bioquímica da UFT. Posteriormente a etapa de extração, os peixes tiveram suas medidas retiradas, tais como, peso e comprimento do corpo e foram fixados em formol (Ishikawa *et al.*, 2010).

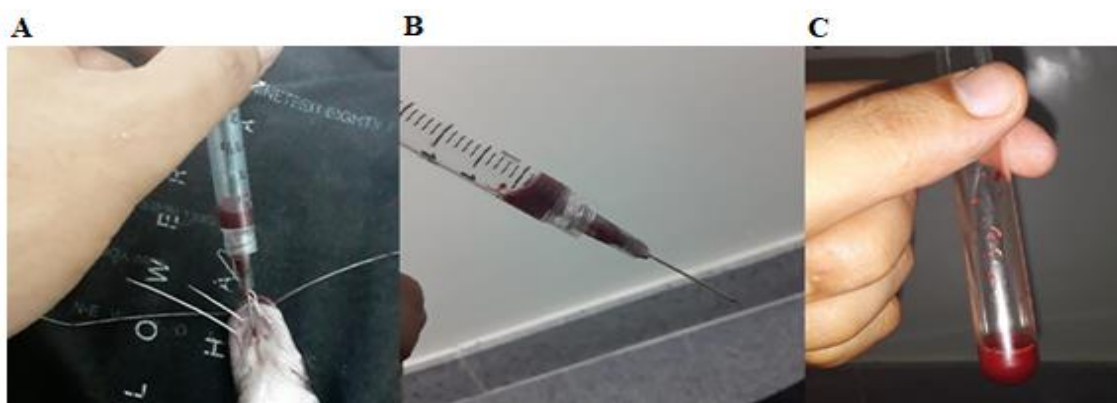


Figura 7: A. Retirada do sangue do corpo do animal com uma seringa anticoagulada; B. resalta o volume sanguíneo extraído; C. sangue transferido para o tubo de ensaio contendo EDTA (fonte: Autor).

Esse protocolo experimental foi baseado nos estudos de Smith, Kane e Popper (2004), Wysockiet *al.*, (2006), Vidal *et al.*, (2006) com informações de Ladich e Fay (2013), sendo feitas adaptações para tornar os procedimentos realizados viáveis, utilizando o método e o material fornecido pela instituição (UFT). Os parâmetros sanguíneos escolhidos para as análises foram as concentrações de glicose e cortisol por serem indicadores de estresse nos peixes ósseos. Para mais detalhes (ver Smith, Kane e Popper (2004); Castro (2006); Barreto e Volpato (2006) e Oliveira (2013)).

Os princípios da análise desses hormônios são em base em testes colorimétricos que utilizam a absorbância padrão da substância alvo, que reage quimicamente com o reagente específico que serão citados a seguir: assim temos a absorbância inversamente proporcional à concentração da espécie química absorvente, e temos os valores quantitativos da absorbância estabelecidos através da leitura em espectrofotômetro e na leitora de placas do Kit Eliza.

O sangue separado para análise do cortisol foi centrifugado a 04°C, a 12.000 rpm durante 15 minutos para obtenção do plasma e mantido a -20° C para a análise desse hormônio em todas as amostras congeladas. Quando finalizado os três tratamentos todas essas amostras de plasma foram levadas ao Campus da UFT de Palmas no Laboratório LAM.

O cortisol plasmático foi analisado através do Kit comercial Cortisol Elisa DLS- 10- 2000 (E-EL-0030 96T) Activitu (Imunoensaio) com leitura em 450 nm, em leitora de microplacas, sendo os valores determinados em ng/mL e mais detalhes sobre o procedimento de preparação da placa e montagem dos reagentes pertencentes ao método pode ser encontrado no próprio manual do Kit (Anexo A).

Os valores de glicose foram realizados imediatamente após a extração e foi dado pelo método enzimático colorimétrico de Trinder (1969), com 10 *ul* de sangue do peixe mais 01 ml do reagente Glicose VET R1 e com o reagente branco sem o sangue. Os tubos de ensaio foram colocados em banho maria por 10 minutos a 37 C°, permaneceram por 05 minutos em temperatura ambiente e logo em seguida foi realizada a leitura em 505 nm no espectrofotômetro (Anexo B).

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas seguiram Smith, Kane e Popper (2004), avaliando os valores entre as amostras pré-estressores e os valores pós-estressores das concentrações do cortisol e glicose nas amostras, assim, analisamos se houve mudança dos níveis de estresse válidas estatisticamente, usando one-way ANOVA e o Teste Tukey nos resultados, através do programa PAST software (Versão 3.26).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados 15 indivíduos, os resultados apresentados aqui são de uma campanha que iniciou a aclimatação no tanque no dia 13 de abril de 2019, depois de 15 dias no dia 27 de abril ocorreu o início do procedimento de isolamento, exposição sonora e punção sanguínea com duração de nove dias; os seis primeiros avaliando os tratamentos de controle e os tratamentos de exposição alternada, e os outros três dias, o tratamento de 10 minutos. No dia 14 de maio de 2019 foram realizadas as análises do cortisol plasmático feitas na cidade de Palmas, dias depois da finalização de todos os experimentos.

Para otimização dos resultados, foram padronizadas as condições fixas no manuseio como a temperatura de 29 C° dentro do Laboratório de Biodiversidade, o que possibilitou mensurar a média geral dos experimentos da temperatura dentro da balde de $26,5 \pm 0,531$ C° e outras condições padrões de qualidade do meio, como salinidade com média de $2,3 \pm 0,380$ mg/L, a condutividade da água em $44 \pm 8,97$, saturação de $28,8 \pm 3,47\%$ e o pH de $7,04 \pm 0,364$.

As Figuras 8, 9 e 10 foram extraídas do Programa R e R-studio e são referentes aos sons que foram expostos aos peixes, esses perfis foram adquiridos realizando testes preliminares para identificar a capacidade da caixa JBS e a posição correta e desejada dos botões de volume dos aparelhos utilizados, para padronizar os experimentos. Essas três imagens demonstram na porção superior, o nível de pressão sonora (SPL) e na porção inferior, o espectrograma de um mesmo arquivo “wav”, ambos em função do tempo e com duração de 5 minutos apenas para caracterizar o perfil acústico do ambiente construído.

4.1 Perfis acústicos

A Figura 8 expressa a condição de controle criada ou a exposição sonora de 0 minutos que apresentou média no nível de pressão sonora (SPL) dentro da área experimental de 107.5 dB re 1 uPa, já no tratamento contínuo de 10 minutos (Figura 9) e no de 30 minutos com a exposição alternada (Figura 10) ambos apresentaram média de 118,1 dB re 1 uPa, a sobreposição sonora dos tratamentos de exposição apontam diferença de SPL de 20 dB re 1 uPa.

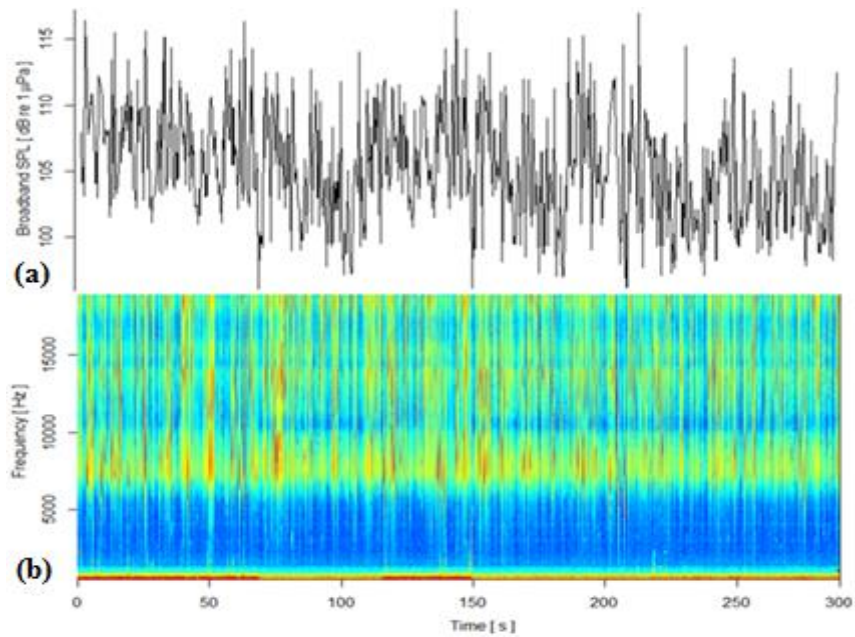


Figura 8: Perfil acústico da condição de controle dentro da área experimental; (a) O nível de pressão sonora (SPL) com média de 107.5 dB re 1 μ Pa; (b) A faixa de frequência de 7 a 20 kHz no espectro, ambas imagens são características de componentes acústicos que pertencem a uma mesma fonte, em (a) ressalta a intensidade e em (b) as frequências fundamentais dos fenômenos originados do funcionamento da bomba de ar (Fonte: Autor).

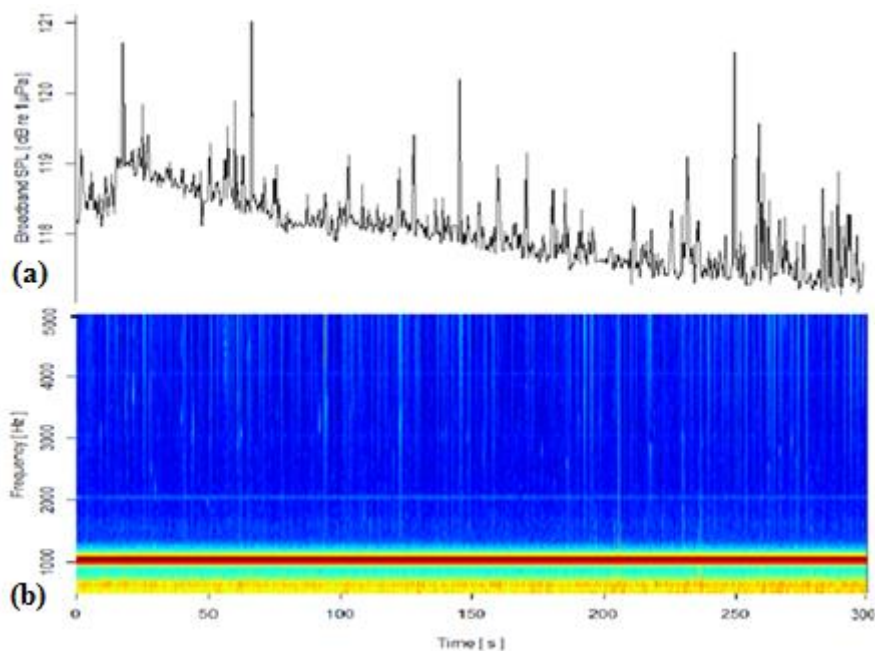


Figura 9: Perfil da exposição sonora contínua de dez minutos; (a) O SPL com média de 118.1 dB re 1 μ Pa, mostrando uma maior sobreposição de ondas criada pelo som ligado juntamente com a bomba de ar também ligada, aumentando a intensidade; (b) O fenômeno gerado pela caixa de som de 1 kHz é mostrado no zoom do espectrograma em 5000 Hz, como essa linha vermelha bem na parte inferior da imagem (Fonte: Autor).

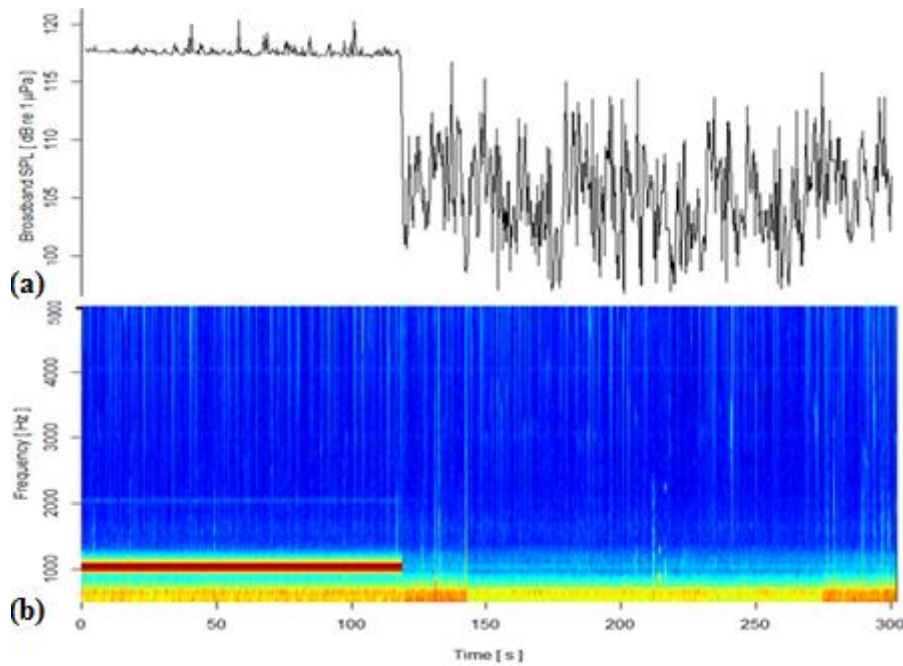


Figura 10: Perfil acústico da condição de exposição sonora alternada; (a) No SPL temos uma média que varia de 20 dB re 1 μ Pa entre as condições alternadas de dois minutos com o som ligado com média de 118.1 dB re 1 μ Pa, para três minutos desligado com média de 107.5 dB re 1 μ Pa, voltando a condição de controle como mostra a figura 3, durante 30 minutos, aqui temos a ênfase no aumento da sobreposição sonora originada da introdução da caixa de som sobre o perfil de controle criado; (b) O espectro é mostrado no zoom de 5000 Hz, com o elemento de 1 kHz registrado nos dois primeiros minutos desse áudio (Fonte: Autor).

Essa pesquisa é a pioneira em exposição sonora com um 1 kHz como estressor para peixes em tempo contínuo e alternado em curto prazo, como já citado, com bases nos audiogramas de *Ostariophysis* por Ladich e Fay, (2013). Portanto nossos resultados não tem relação com trabalhos feitos em ambientes naturais. Sendo que na natureza os sons humanos que estressam assembleias de peixes são produzidos por gravações de motores de barcos com média de 153 dBs e a frequência específica dos ruídos expostos foram de 0 a 2.5 kHz na pesquisa de Wisocky *et al.*, (2006).

Em outro estudo, também com exposição a ruído de barcos, influenciaram o estresse em peixes da espécie *Heterostichus rostratus*, demonstrando que a variabilidade do ambiente pode estressar mais o animal do que ao tempo de exposição de certos fenômenos. Nesse trabalho, os autores utilizaram gravações com a aceleração do barco, com distância de 4 a 20 metros, usando um controle, como gravação de ambiente de campo e um outro controle com ambiente de laboratório, e consideraram a

aplicação desses tratamentos de modo aleatório, como intermitente, o que resultou no aumento do estresse (Nichols *et al.*, 2015).

Na pesquisa de Sierra-Flores *et al.*, (2015) com juvenis de *Gadus morhua*, utilizaram um ruído de baixa frequência (100–1000 Hz), com três tratamentos de 9.1, 13.3 e 15.3 dBs, com voltagem de 10, 15 e 20V, respectivamente, com esses dados, reforça a ideia do presente trabalho em utilizar 1000 Hz, em contraponto utilizamos uma alta intensidade de 118.1 dBs usando a capacidade máxima da nossa caixa de som. Em Kane, Smith e Popper, (2004), o ruído característico exposto para o peixe dourado variou de 0,1 kHz à 10 kHz, para peixes criados em ambiente calmo (110–125 · dB re 1 · μ Pa), e para condições com barulho (160–170 dBs), ruído branco. As pesquisas citadas acima serão discutidas a seguir; considerando que cada espécie possui uma resposta fisiológica específica em relação ao predador ou adversário, assim cada animal tem sua própria maneira de superar um estressor específico (Barreto e Volpato, 2006).

No presente estudo foi notado uma sobreposição das ondas sonoras entre os tratamentos e teorizamos que essa sobreposição também ocorre para o estresse fisiológico dos peixes em curto prazo, à exposição ao som, assim podendo ocorrer um estresse acumulado pelo manuseio padrão que possivelmente aumenta quando o animal é exposto aos tratamentos sonoros.

4.2 Estresse fisiológico

Na Figura 11 a concentração de cortisol em (A) e de glicose em (B) na condição controle teve médias de $80.0 \pm 36.0 \text{ ng/mL}^{-1}$ e $205 \pm 71.8 \text{ mg/dL}^{-1}$ respectivamente, o nível dessas substâncias no sangue indica estresse e na pesquisa foi relativamente baixo, comparado aos outros tratamentos, desde aqui, possivelmente, a própria condição de controle pode causar estresse aos peixes. Já o estresse resultante no tratamento contínuo de 10 minutos teve uma concentração de $288 \pm 177.2 \text{ ng / mL}^{-1}$ em cortisol e $415 \pm 38.5 \text{ mg / dL}^{-1}$ em glicose, e no tratamento de exposição alternada de 30 minutos eles tiveram a média de $296 \pm 245.5 \text{ ng / mL}^{-1}$ de cortisol e $382 \pm 141.7 \text{ mg/dL}^{-1}$ de glicose.

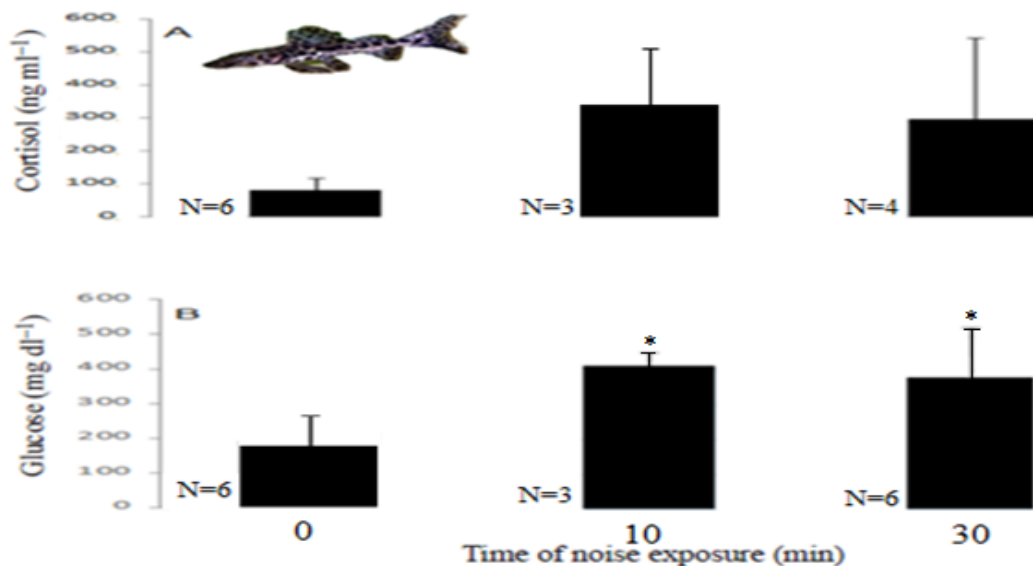


Figura 11: A imagem é um gráfico das concentrações de cortisol em ng/mL^{-1} e glicose em mg/dL^{-1} , no plano vertical e ambos valores são da mesma amostra, sobre os tratamentos de controle (0 minutos), de exposição contínua (10 minutos) e o de exposição alternada (30 minutos), na horizontal (o gráfico foi montado seguindo ordem crescente do tempo de exposição do ruído); (A) Na parte superior da imagem é ilustrado o peixe (*P. Corruscans*), junto com os valores de cortisol com médias de $80.0 \pm 36.0 \text{ ng/mL}^{-1}$; de $288 \pm 177.2 \text{ ng/mL}^{-1}$ e de $296 \pm 245.5 \text{ ng/mL}^{-1}$; Já na imagem (B) é apontado os valores da glicose com as médias de $205 \pm 71.8 \text{ mg/dL}^{-1}$; de $415 \pm 38.5 \text{ mg/dL}^{-1}$ e de $382 \pm 141.7 \text{ mg/dL}^{-1}$, para os tratamentos de 0, de 10 e 30 minutos de exposição, respectivamente. O asterix representa o nível significativo de diferença entre os valores, ($P=0.01$). Tanto em (A) como em (B), é colocado ao lado de cada coluna o número de repetições usados nos tratamentos (fonte: Autor).

Segundo Schreck *et al.*, (2001), o estresse aumenta desencadeado por uma cascata trófica fisiológica. Primeiro o eixo hipófise- hipotálamo sintetiza e libera a substância ACTH no sangue, onde atinge as glândulas renais que sintetizam e liberam adrenalina e cortisol no sangue, e por consequência, o cortisol influencia a liberação de glicose pelo fígado. Nos nossos dados, indicou que os tratamentos de 10 minutos e 30 minutos causaram um aumento no estresse fisiológico dessa espécie. Embora visualmente no gráfico é possível observar uma nitida mudança, quando aplicado ao Teste one-way ANOVA e pelo Teste Tukey, para o cortisol, que essa mudança não é significativa ao $<P=0.047$, no entanto, para os valores de glicose ambos os testes de 10 e 30 minutos indicaram valores significativos a $<p=0.015$.

A exposição ao ruído não afetou significativamente o nível de cortisol, tendo relevância apenas nas concentrações de glicose comparado ao controle. Nos resultados de concentração de cortisol de Smith, Kane e Popper, (2004), apontaram aumento no

estresse em curto prazo em *Carassius auratus* (godfish), também com 10 minutos de exposição ao som, porém a glicose não apresentou diferenças, e os testes de longo prazo com 24 de exposição para eles também não foram significativos.

Em outro estudo que analisou o cortisol liberado na água, mostrou-se com valores significativos, principalmente quando em relação aos níveis maiores dessas substâncias quando avaliado do estresse advindo da exposição sonora de gravações de ruído de barcos por 30 minutos. Entretanto, em três espécies de peixes europeus, enquanto o ruído neutro (gaussiano), não foram observadas diferenças entre as espécies e nem em seus controles (Wysocki et al., 2006). No presente estudo utilizamos o ruído de 1 (um) kHz, também com 30 minutos de duração, porém de modo alternado, mas comparando nossas respostas ao estresse observado pelo autor mencionado anteriormente, ambos se mostraram elevadas. Dessa maneira, mostra-se interessante a investigação do efeito do barulho de barcos em *P. Corruscans*.

Outra investigação utilizando gravações de ruídos de barcos em aquários apontou aumento no cortisol nos peixes da espécie *Heterostichus rostratus*, expostos ao som intermitente aleatório, ou seja, um ruído inesperado, indicando que o fator surpresa também pode influenciar no estresse (mais detalhes veja; Nicolas et al., 2015), no presente estudo pode indicar a relevância no estresse gerado pela exposição alternada, nos dados significativos da glicose, pois o ruído alternado de fontes variadas também ocorre no meio natural e influenciam o estresse nos animais, o que pode ser transformado em comportamento anômalos.

Em *Gadus morhua*, bacalhau do atlântico, foi observado que ruídos de 100-1000 Hz, expostos por 20 minutos com tratamentos com intensidade de 15,3 e 13,3 dBs, e o tratamento com intensidade de 9,1 dBs, porém foi na exposição de 10 minutos denotam picos na concentração de cortisol, apresentando significância para o estresse nessa espécie (Sierra-Flores et al., 2015), também foi notado que após 20 a 40 minutos às concentrações de cortisol retornaram a níveis iniciais, como também ressaltado por Smith, Kane e Popper, (2004), para o período de 60 minutos.

Ainda existem poucos estudos que investigam os efeitos sonoros na vida dos peixes, porém há pesquisas indicando que algumas espécies de peixes são resistentes à indução de ruído antropogênico causados por pilotagens, como observado com *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum, 1792), conhecido no Brasil como Salmão-rei (Casper e Popper, 2012). Existem também peixes que se acostumam com certos estressores, voltando ao seu nível de cortisol de homeostase (10 ng/mL) como se não

existissem fatores estressantes (Cyr e Romero, 2009), contudo, outros peixes realizam mudanças comportamentais aos efeitos de exposição do som em ambientes, como por exemplo, o tráfego de embarcações (Iafrate e Watwold, 2016).

Embora o comportamento não seja afetado mesmo que haja respostas sinápticas consideradas no sistema nervoso central do animal (Sisneros et al., 2016), nessa pesquisa analisou-se o comportamento dos níveis de estresse fisiológico sobre o isolamento e exposições de ruídos no balde e não a do animal se deslocando dentro de um aquário, como exemplo, considerando que cada peixe estava confinado, apontamos que os tratamentos de exposição em curto prazo de dez e trinta minutos causaram maior acúmulo dos hormônios do que visto no controle. Tipos de confinamentos específicos podem aumentar o nível de estresse como observado em *Oreochromis mossambicus* espécie de Tilapia, (Nolan et al., 1999).

Sobre a área de confinamento, sabe-se que existe certa complexidade de se entender a repercussão do som em tanques (veja: Campbell et al., 2019; Popper et al., 2019), como também em baldes e outros recipientes; o que pode causar maior resposta ao estresse à peixes expostos a esses tipos de experiência, como também o efeito do manuseio humano sobre o peixe usado, aqui o primeiro e segundo isolamento mencionado na metodologia acima, fazem parte do manuseio padrão criado nessa pesquisa e a aplicação desse manuseio, foi inestimável para a obtenção dos resultados, pois permitiu a mesma sequência nas nossas ações para ambos tratamentos.

No Brasil, poucos trabalhos foram feitos sobre o efeito do ruído antropogênico na vida dos peixes, um dos mais recentes apontou variação no comportamento de *Leporinus taeniatus* causado pela exposição de ruído de turbina de barragens hidrelétricas (Duarte et al., 2019). No país, embora os estudos atuais objetivam a investigação da paisagem acústica no litoral (Campbell, 2018) entre vocalizações de cetáceos e ruídos antropogênicos (Rossi-Santos, 2014; Martins et al., 2018), ainda são considerados escassos.

4.3. Considerações finais

No presente trabalho moldamos nossa metodologia e obtivemos sucesso na criação de um manuseio padrão para esse tipo de experimento, capaz de orientar futuras pesquisas, buscando a visibilidade desses estudos na fauna da região, pois pouco se sabe sobre os efeitos do ruído sobre peixes de águas neotropicais causados pelo som produzido por represas hidrelétricas e outras fontes antropogênicas causadoras de efeitos negativos para animais aquáticos. Nessa pesquisa foi indicado o aumento do estresse fisiológico na espécie, porém colocamos à necessidade de realizar futuros estudos relacionados às respostas comportamentais e fisiológicas de peixes neotropicais sobre influência de sons em áreas de risco, para poder delinear melhores maneiras de conservação da ictiofauna e de controle/regulação do ruído humano no ambiente subaquático.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, M. M. (2012). *Fisiologia*. 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 288-1335.
- Agostinho, A. A., Gomes, L. C., & Pelicice, F. M. (2007). Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. *Maringá: Eduem*, 501.
- Akamatsu, T., Wang, D., Wang, K., & Nait, Y. (2005). Biosonar behaviour of free-ranging porpoises. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1565), 797-801.
- Barreto, R. E. & Volpato, G. I. (2006). Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(12), 1605-1612.
- Bleckmann, H. (1986). Role of the lateral line in fish behaviour. In *The behaviour of teleost fishes*. Springer, Boston, MA. 177-202.
- Bradbury, J. W., Vehrencamp, S. L. (1998). Principles of animal communication. Sinauer Associate. Inc., Sunderland, Mass.
- Bonga, S. E. Wenderlaar. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Caldas-Morgan, M., Alvarez-Rosario, A., & Padovese, L. R. (2015). An autonomous underwater recorder based on a single board computer. *PloS one*, 10(6), e0130297.
- Campbell, D. A. Estudo da paisagem acústica submarina na região do Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha, IEAPM/UFF, 2018.
- Campbell, T.W., & Murru, F. (1990). An introduction to fish hematology. *Compend. Cont. Educ. Prod. Vet*, 124, 525-532.
- Campbell, J. (2019). "Particle motion and sound pressure in fish tanks: A behavioural exploration of acoustic sensitivity in the zebrafish," *Behav. Process.* 164, 38–47.
- Casper, B. M., Popper, A. N., Matthews, F., Carlson, T. J., & Halvorsen, M. B. (2012). Recovery of barotrauma injuries in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* from exposure to pile driving sound. *PloSone*, 7(6), e39593.
- Castro, F. J. (2006). Respostas fisiológicas, Morfofuncionais e do sistema imune não adaptativo do hospedeiro frente à infestação experimental. Tese (doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, CDD:612.11822.
- Celi, M., Filiciotto, F., Parrinello, D., Buscaino, G., Damiano, A., Cuttitta, A., Angelo, S., Mazzola, S., & Vazzana, M. (2013). Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. *The Journal of Experimental Biology*. 216, 709-718.
- Codarim, A., Wysocki, L., Ladich F., & Picciulin M. (2009). Effects of ambient and boat noise on hearing and communication in three fish species living in a marine protected area (Miramare, Italy). *Marine pollution bulletin*, 58(12), 1880-1887.
- Colpaert, W., Briones, R. L., Chiang, G., & Sayigh, L (2016). Blue whales of the Chiloé-Corcovado region, Chile: Potential for anthropogenic noise impacts. In *Proceedings of Meetings on Acoustics 4ENAL 27 (1)*, 040009. ASA.
- Cyr, N.E., & Romero, L.M. (2009). Identifying hormonal habituation in field studies of stress. *General Comp. Endocrinol.* 161, 295-303.
- David, H. E., & James, B. C. (2005). *The physiology of fishes*. 3. QL6391849.

- Deng, X., Wagner, H. J., & Popper, A. N. (2013). Interspecific Variations of Inner Ear Structure in the Deep-Sea Fish Family Melamphaidae. *The Anatomical Record*, **296**(7), 1064-1082.
- Donaldson, E. M. (1981). The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. *Stress and fish*, 11-47.
- Duarte, M. H., Melo, R. M., Scarpelli, M. D., Carvalho, T. M., Padovese, L. R., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2019). Effects of hydroelectric turbine noise on the behaviour of *Leporinustaeniatus* (Characiformes: Anostomidae) in captivity. *Journal of Ethology*, **37**(1), 59-65.
- Fay, R. R., & Wilber, L. A. (1989). Hearing in vertebrates: a psycho physics databook.
- Filiciotto, F., Vazzana, M., Celi, M., Maccarrone, V., Ceraulo, M., Buffa, G. ... & Buscaino, G. (2016). Underwater noise from boats: Measurement of its influence on the behaviour and biochemistry of the common prawn (*Palaemon serratus*, Pennant 1777). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **478**, 24-33.
- Godinho, A. L., Kynard, B., Godinho, H. P. (2007). Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, **80**(4), 421-433.
- Hawkins, A. D., Myrberg, A. A. (1983). Hearing and sound communication under water. *Bioacoustics, a comparative approach*. Academic Press, London, 347-405.
- Hildebrand, M., Goslow, G. (2006). Análise da estrutura dos vertebrados. *Atheneu*, **2**, 345-352.
- Iafrate, J. D., Watwood, S. L., Reyier, E. A., Scheidt, D. M., Dossot, G. A., & Crocker, S. E. (2016). Effects of Pile Driving on the Residency and Movement of Tagged Reef Fish. *PLoS One*, **11**. e0163638.
- Ishikawa, M. M., PÁDUA, S. D., Satake, F., de PIETRO, P. S., & Hisano, H. (2010). Procedimentos básicos para colheita de sangue em peixes. *Embrapa Agropecuária Oeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- Ladich, F., Winkler, H. (2017). Acoustic communication in terrestrial and aquatic vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, **220**(13), 2306-2317.
- Ladich, F., Popper, A. N. (2004). Parallel evolution in fish hearing organs. In *Evolution of the Vertebrate Auditory System*. Springer, 95-127.
- Ladich, F., Bass, A. H. (2011). Vocal behavior of fishes: anatomy and physiology. In *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, **1** (ed. A. P. Farrell), 321-329.
- Ladich, F., Fay, R. R. (2013). Auditory evoked potential audiometry in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **23**(3), 317-364.
- Ladich, F. (2014). Fish bioacoustics. *Current opinion in neurobiology*, **28**, 121-127.
- Ladich, F. (2016). Peripheral hearing structures in fishes: diversity and sensitivity of catfishes and cichlids. In: *Fish Hearing and Bioacoustics*. Springer, Cham, 321-340.
- Lechner, W., Ladich, F. (2008). Size matters: diversity in swim bladders and Weberian ossicles affects hearing in catfishes. *The Journal of Experimental Biology* **211**, Published by the Company of Biologists, 1681-1689.
- Lugli, M. (2015). Habitat acoustics and the low-frequency communication of shallow water fishes. In *Sound Communication in Fishes* (ed. F. Ladich). Wien: Springer-Verlag, 175-206.

- Lundstedt, L. M., Melo, J. F., & Moraes, G. (2004). Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **137**(3), 331-339.
- Kenyon, T. N., Ladich, F., & Yan, H. Y. (1998). A comparative study of hearing ability in fishes: the auditory brainstem response approach. *Journal of Comparative Physiology A*, **182**(3), 307-318.
- Martins, Dalila T. Leão, Marcos R. Rossi-Santos, and Flávio José De Lima Silva. (2018). "Effects of anthropogenic noise on the acoustic behaviour of *Sotalia guianensis* (Van Bénédén, 1864) in Pipa, North-eastern Brazil." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **98**(2), 215-222.
- Mccauley, R. D., Fewtrell, J., & Popper, A. N. (2003). High intensity anthropogenic sound damages fish ears. *The Journal of the Acoustical Society of America*, **113**, 1-5.
- Mcdonald, G., & Milligan, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., & Schreck, C. B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University press, 119-144.
- Merchant, N. D., Fristrup, K. M., Johnson, M. P., Tyack, P. L., Witt, M. J., Blondel, P., & Parks, S. E. (2015). Measuring acoustic habitats. *Methods in Ecology and Evolution*, **6**(3), 257-265.
- Mirbach, S. T. & Ladich, F. (2016). Diversity of inner ears in fishes: possible contribution towards hearing improvements and evolutionary considerations. In: *Fish Hearing and Bioacoustics*. Springer: Cham, 341-391.
- Narins, P. M., Stoeger, A. S., & Connell, R. C. (2016). Infrasonic and seismic communication in the vertebrates with special emphasis on the Afrotheria: An update and future directions. In *Vertebrate Sound Production and Acoustic Communication* (ed. R. A. Suthers, W. T. Fitch, R. R. Fay and A. N. Popper). Cham: Springer, 191-227.
- Nedelec, S. L., Radford, A. N., Simpson, S. D., Nedelec, B., Lecchini, D., & Mills, S. C. (2014). Anthropogenic noise playback impairs embryonic development and increases mortality in a marine invertebrate. *Sci. Rep.* **4**, 5891.
- Nedelec, S. L., Mills, S. C., Lecchini, D., Nedelec, B., Simpson, S. D., & Radford, A. N. (2016). Repeated exposure to noise increases tolerance in a coral reef fish. *Environmental pollution*, **216**, 428-436.
- Neo, Y. Y., Seitz, J., Kastelein, R. A., Winter, H. V., Ten Cate, C., & Slabbekoorn, H. (2014). Temporal structure of sound affects behavioural recovery from noise impact in European seabass. *Biological Conservation* **178**, 65-73.
- Nichols, T. A., Anderson, T. W., & Širović, A. (2015). Intermittent noise induces physiological stress in a coastal marine fish. *PLoS One*, **10**(9), e0139157.
- Nolan, D. T., Op't Veld, R. L. J. M., Balm, P. H. M. and Wendelaar Bonga, S. E. (1999). Ambient salinity modulates the response of tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), to net confinement. *Aquaculture* **177**, 297-309.
- Ortiz, G. (2011). Comportamento alimentar, Biogeografia e estudo bioacústico de periquito rico, *Brotogeris tirica* (aves, Psittacidae) no estado de São Paulo, campus de Botucatu – SP.
- Parker, G. H. (1903). The sense of hearing in fishes. *The American Naturalist*. **37**, 185-204.
- Popper, A. N., Hawkins, A. D., Sand, O., & Sisneros, J. A. (2019). Examining the hearing abilities of fishes. *The Journal of the Acoustical Society of America*, **146**(2), 948-955.

- Popper, A. N. & Carlson, T. J. (1998). Application of Sound and Other Stimuli to Control Fish Behavior. *Transactions of the American Fisheries Society*, **127**, 673-707.
- Popper, A. N., & Fay, R. R. (1973). Sound detection and processing by teleost fishes: a critical review. *The Journal of the Acoustical Society of America*, **53**(6), 1515-1529.
- Popper, A. N. & Hawkins, A. (2012). The Effects of Noise on Aquatic Life. *Springer Science+Business Media*, **730**.
- Popper, A. N., Fewtrell, J., Smith, M. E., McCauley, R. D. (2003). Anthropogenic sound: effects on the behavior and physiology of fishes. *Marine Technology Society Journal*, **37**(4), 35-40.
- Popper, A. N., & Schilt, C.R. (2008). Hearing and acoustic behavior (basic and applied). In: Fish Bioacoustics, eds. WEBB, J.F.; FAY, R.R.; POPPER, A.N. Springer Science+Business Media, New York, LLC.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B. (2008). A vida dos vertebrados. São Paulo: Atheneu Editora. **4**.
- Randall, D. J. & Perry, S. F. (1992). Catecholamines. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., & Farrell, A. P. Fish physiology. San Diego: Academic Press, p. 255-300.
- Rastings, M. C., Popper, A. N., Finneran, J. J., Lanford, P. J. (1996). Effects of low-frequency underwater sound on hair cells of the inner ear and lateral line of the teleost fish *Astronotus ocellatus*. *The Journal of the Acoustical Society of America*, **99**, 1759-1766
- Rossi-Santos, Marcos R. (2014). Oil industry and noise pollution in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) soundscape ecology of the southwestern Atlantic breeding ground. *Journal of Coastal Research*, v. **31**(1), p. 184-195.
- Sierra-Flores, R., Atack, T., Migaud, H., & Davie, A. (2015). Stress response to anthropogenic noise in Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquacultural engineering*, **67**, 67-76.
- Sisneros, J. A., Popper, A. N., Hawkins, A. D., and Fay, R. R. (2016). "Auditory evoked potential audiograms compared to behavioral audiograms in aquatic animals," in *The Effects of Noise on Aquatic Life II*, edited by A. N. Popper and A. D. Hawkins (Springer Science+Business Media, New York), pp. 1049–1056.
- Schneider, H. (1967). Morphology and physiology of sound-producing mechanisms in teleost fishes. In *Marine Bio-Acoustics*. Edited by Tavolga W.N. Oxford: Pergamon Press, **2**. 135-158.
- Schreck, C. B., Contreras-S. W. & Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, **197**, 3-24.
- Slabberkoorn, H., Popper, A. N., & Bouton, N. (2010). A noisy spring: the impact of globally rising underwater sound levels on fish trends in ecology & evolution, **25** (7), 419 -427.
- Smith, M. E., Kane, A. S., & Popper, A. N. (2003). Noise-induced stress response and hearing loss in goldfish (*Carassius auratus*). *The Journal of Experimental Biology*, **207**, 427-435.
- Souza, A. B. et al. (1997). Análise cromossômica do surubim *Pseudoplatystomacorruscans* das bacias dos rios São Francisco e Paraguai. In: Miranda, M.O.T. (Org.). *Surubim*. Belo Horizonte: Ibama. cap. **4**, 57-68.
- Spiga, I., Aldred, N., & Caldwell, G. S. (2017). Anthropogenic noise compromises the anti-predator behaviour of the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Marine Pollution Bulletin*, **122**, 297-305.

- Tavolga, W. N. (1960). Sound production and underwater communication in fishes. In Animal Sounds and Communication. Edited by Lanyon W. E., Tavolga W. N. Washington, DC: *American Institute of Biological Sciences*: 93-136.
- Tyack, P.L. & Miller, E.H. (2002). Vocal anatomy, acoustic communication and echolocation, in *Marine Mammal Biology: an Evolutionary Approach*, edited by A.R. Hoelzel (Blackwell Science, Oxford, UK), 142-184.
- Vasconcelos, R. O., Amorim, M. C., & Ladich, F. (2007). Effects of ship noise on the detectability of communication signals in the Lusitanian toadfish. *The Journal of Experimental Biology*, **210**, 2104-2112.
- Vidal, L. V., Albinati, R. C., Albinati, A. C. & Mécêdo, G. R. (2006). Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). *Acta Scientiarum Biological Sciences*. Maringá, **28**(3). 275-279.
- Weber, E. H. (1820). De Aure et Auditu Hominis et Animalium. Pars I. De Aure Animalium Aquatiliu. Leipzig: Gerhard Fleischer.
- Wedemeyer, G. A. & Mcleay, D. J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A.D. Stress and fish. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: *Academic Press*, 247-275.
- Wysocki, L. E., Dittami, J. P. & Ladich, F. (2006). Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes. *Biological Conservation*, **128**, 501-508.
- Zadunaisky, J. A. (1984). The chloride cell: The active transport of chloride and the paracellular pathways. In: Hoar, W. S. & Randall, D. J. *Fish Physiology*. New York: Academic Press, I/B, 129-176.

Links Para download dos programas:

Audacity

<https://audacity.br.uptodown.com/windows>

R e R studio

<https://rstudio.com/products/rstudio/download/>

Past software

<https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/PAST.shtml>

ANEXOS A e B

(FOR RESEARCH USE ONLY. DO NOT USE IT IN CLINICAL DIAGNOSTICS !)

Cortisol ELISA Kit

Synonyms: Cortisol

Catalog No : E-EL-0030
96T

This manual must be read attentively and completely before using this product.

If you have any problems, please contact our Technical Service Center for help (info in the header of each page).

Phone: 240-252-7368(USA) 240-252-7376(USA)

Email: techsupport@elabscience.com

Website: www.elabscience.com

Please refer to specific expiry date from label on the side of box.

Please kindly provide us with the lot number (on the outside of the box) of the kit for more efficient service.

Intended use

This ELISA kit applies to the in vitro quantitative determination of Cortisol concentrations in serum, plasma and other biological fluids.

Specification

●Sensitivity: 7.50 ng/mL

●Detection Range: 12.50-800 ng/mL

●Specificity: This kit recognizes Cortisol in samples. No Significant cross-reactivity or interference between Cortisol and analogues was observed.

●Repeatability: Coefficient of variation is < 10%.

Test principle

This ELISA kit uses the Competitive-ELISA principle. The micro ELISA plate provided in this kit has been pre-coated with Cortisol. During the reaction, Cortisol in the sample or standard competes with a fixed amount of Cortisol on the solid phase supporter for sites on the Biotinylated Detection Ab specific to Cortisol. Excess conjugate and unbound sample or standard are washed from the plate, and Avidin conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP) are added to each microplate well and incubated. Then a TMB substrate solution is added to each well. The enzyme-substrate reaction is terminated by the addition of stop solution and the color change is measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm \pm 2 nm. The concentration of Cortisol in the samples is then determined by comparing the OD of the samples to the standard curve.

Kit components & Storage

An unopened kit can be stored at 4°C for 1 month. If the kit is not used within 1 month, store the items separately according to the following conditions once the kit is received.

Item	Specifications	Storage
Micro ELISA Plate (Dismountable)	8 wells ×12 strips	-20°C, 6 months
Reference Standard	2 vials	
Concentrated Biotinylated Detection Ab (100×)	1 vial, 120 µL	
Concentrated HRP Conjugate (100×)	1 vial, 120 µL	-20°C(shading light), 6 months
Reference Standard & Sample Diluent	1 vial, 20 mL	4°C, 6 months
Biotinylated Detection Ab Diluent	1 vial, 14 mL	
HRP Conjugate Diluent	1 vial, 14 mL	
Concentrated Wash Buffer (25×)	1 vial, 30 mL	
Substrate Reagent	1 vial, 10 mL	4°C(shading light)
Stop Solution	1 vial, 10 mL	4°C
Plate Sealer	5 pieces	
Product Description	1 copy	
Certificate of Analysis	1 copy	

Note: All reagent bottle caps must be tightened to prevent evaporation and microbial pollution.

The volume of reagents in partial shipments is a little more than the volume marked on the label, please use accurate measuring equipment instead of directly pouring into the vial(s).

Other supplies required

Microplate reader with 450 nm wavelength filter

High-precision transfer pipette, EP tubes and disposable pipette tips

Incubator capable of maintaining 37°C

Deionized or distilled water

Absorbent paper

Loading slot for Wash Buffer

Note

1. Please wear lab coats, eye protection and latex gloves for protection. Please perform the experiment following the national security protocols of biological laboratories, especially when detecting blood samples or other bodily fluids.
2. A freshly opened ELISA Plate may appear to have a water-like substance, which is normal and will not have any impact on the experimental results.
3. Do not reuse the diluted standard, biotinylated detection Ab working solution, concentrated HRP conjugate working solution. The unspent undiluted concentrated biotinylated detection Ab (100×) and other stock solutions should be stored according to the storage conditions in the above table.
4. The microplate reader should have a 450(±10 nm) filter installed and a detector that can detect the wavelength. The optical density should be within 0~3.5.
5. Do not mix or use components from other lots.
6. Change pipette tips in between adding standards, in between sample additions, and in between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.

Sample collection

Serum: Allow samples to clot for 2 hours at room temperature or overnight at 4°C before centrifugation for 15 min at 1000×g at 2~8°C. Collect the supernatant to carry out the assay. Blood collection tubes should be disposable and be non-endotoxin.

Plasma: Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge samples for 15 min at 1000×g at 2~8°C within 30 min of collection. Collect the supernatant to carry out the assay. Hemolysed samples are not suitable for ELISA assay!

Cell lysates: For adherent cells, gently wash the cells with moderate amount of pre-cooled PBS and dissociate the cells using trypsin. Collect the cell suspension into a centrifuge tube and centrifuge for 5 min at 1000×g. Discard the medium and wash the cells 3 times with pre-cooled PBS. For each 1×10^6 cells, add 150-250 μ L of pre-cooled PBS to keep the cells suspended. Repeat the freeze-thaw process several times until the cells are fully lysed. Centrifuge for 10min at 1500×g at 4°C. Remove the cell fragments, collect the supernatant to carry out the assay. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Tissue homogenates: It is recommended to get detailed references from the literature before analyzing different tissue types. For general information, hemolysed blood may affect the results, so the tissues should be minced into small pieces and rinsed in ice-cold PBS (0.01M, pH=7.4) to remove excess blood thoroughly. Tissue pieces should be weighed and then homogenized in PBS (tissue weight (g): PBS (mL) volume=1:9) with a glass homogenizer on ice. To further break down the cells, you can sonicate the suspension with an ultrasonic cell disrupter or subject it to freeze-thaw cycles. The homogenates are then centrifuged for 5 min at 5000×g to get the supernatant

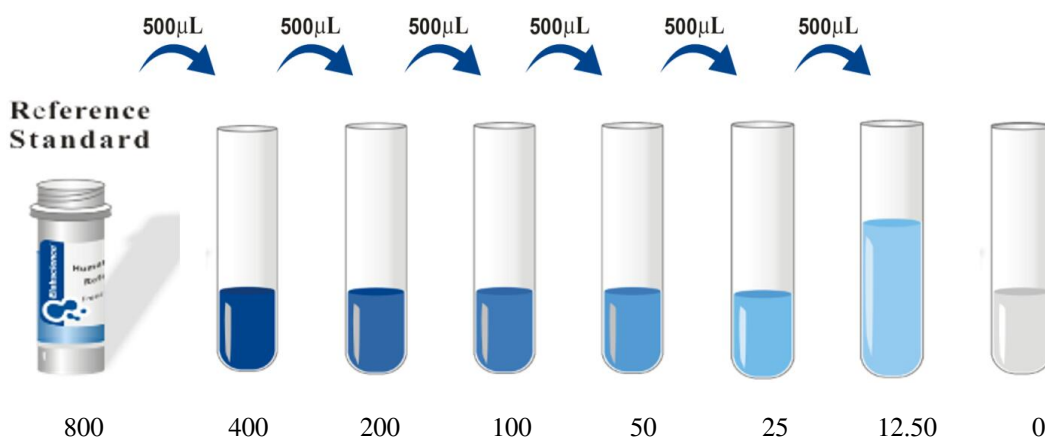
Cell culture supernatant or other biological fluids: Centrifuge samples for 20 min at 1000×g at 2~ 8°C. Collect the supernatant to carry out the assay.

Note for sample:

1. Samples should be assayed within 7 days when stored at 4°C, otherwise samples must be divided up and stored at -20°C (≤ 1 month) or -80°C (≤ 3 months). Avoid repeated freeze-thaw cycles.
2. Please predict the concentration before assaying. If the sample concentration is not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments.
3. If the sample type is not included in the manual, a preliminary experiment is suggested to verify the validity.
4. If a lysis buffer is used to prepare tissue homogenates or cell culture supernatant, there is a possibility of causing a deviation due to the introduced chemical substance.
5. Some recombinant protein may not be detected due to a mismatching with the detection antibody.

Reagent preparation

1. Bring all reagents to room temperature (18~25°C) before use. Follow the Microplate reader manual for set-up and preheat it for 15 min before OD measurement.
2. **Wash Buffer:** Dilute 30 mL of Concentrated Wash Buffer with 720 mL of deionized or distilled water to prepare 750 mL of Wash Buffer. Note: if crystals have formed in the concentrate, warm it in a 40°C water bath and mix it gently until the crystals have completely dissolved.
3. **Standard working solution:** Centrifuge the standard at 10,000×g for 1 min. Add 1.0 mL of Reference Standard & Sample Diluent, let it stand for 10 min and invert it gently several times. After it dissolves fully, mix it thoroughly with a pipette. This reconstitution produces a working solution of 800 ng/mL. Then make serial dilutions as needed. The recommended dilution gradient is as follows: 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.50, 0 ng/mL.
Dilution method: Take 7 EP tubes, add 500uL of Reference Standard & Sample Diluent to each tube. Pipette 500uL of the 800 ng/mL stock solution to the first tube and mix up to produce a 400 ng/mL working solution. Pipette 500uL of the solution from the former tube into the latter one according to these steps. The illustration below is for reference. Note: the last tube is regarded as a blank. Don't pipette solution into it from the former tube.



4. **Biotinylated Detection Ab working solution:** Calculate the required amount before the experiment (50 µL/well). In preparation, slightly more than calculated should be prepared. Centrifuge the stock tube before use, dilute the 100× Concentrated Biotinylated Detection Ab to 1×working solution with Biotinylated Detection Ab Diluent.
5. **Concentrated HRP Conjugate working solution:** Calculate the required amount before the experiment (100 µL/well). In preparation, slightly more than calculated should be prepared. Dilute the 100× Concentrated HRP Conjugate to 1× working solution with Concentrated HRP Conjugate Diluent.

Assay procedure (A brief assay procedure is on the 11th page)

1. Add the **Standard working solution** to the first two columns: Each concentration of the solution is added in duplicate, to one well each, side by side (50 uL for each well). Add the samples to the other wells (50 uL for each well). Immediately add 50µL of **Biotinylated Detection Ab working solution** to each well. Cover the plate with the sealer provided in the kit. Incubate for 45 min at 37°C. Note: solutions should be added to the bottom of the micro ELISA plate well, avoid touching the inside wall and causing foaming as much as possible.
2. Aspirate or decant the solution from each well, add 350 uL of **wash buffer** to each well. Soak for 1~2 min and aspirate or decant the solution from each well and pat it dry against clean absorbent paper. Repeat this wash step 3 times. Note: a microplate washer can be used in this step and other wash steps.
3. Add 100 µL of **HRP Conjugate working solution** to each well. Cover with the Plate sealer. Incubate for 30 min at 37°C.
4. Aspirate or decant the solution from each well, repeat the wash process for five times as conducted in step 2.
5. Add 90 µL of **Substrate Reagent** to each well. Cover with a new plate sealer. Incubate for about 15 min at 37°C. Protect the plate from light. Note: the reaction time can be shortened or extended according to the actual color change, but not more than 30min.
6. Add 50 µL of **Stop Solution** to each well. Note: Adding the stop solution should be done in the same order as the substrate solution.
7. Determine the optical density (OD value) of each well at once with a micro-plate reader set to 450 nm.

Calculation of results

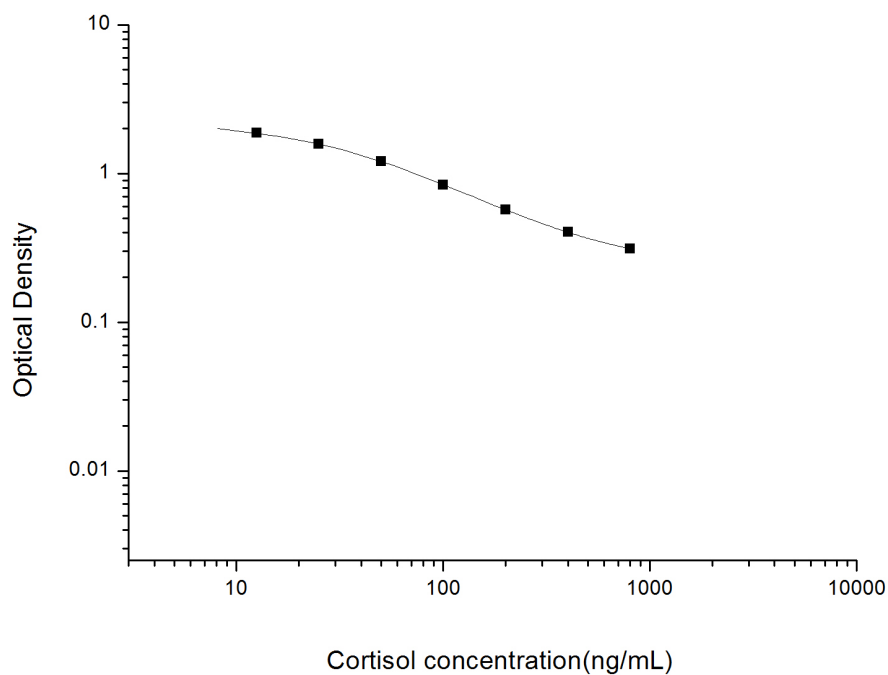
Average the duplicate readings for each standard and samples. Plot a four-parameter logistic curve on log-log graph paper, with standard concentration on the x-axis and OD values on the y-axis.

If the samples have been diluted, the concentration calculated from the standard curve must be multiplied by the dilution factor. If the OD of the sample surpasses the upper limit of the standard curve, you should re-test it with an appropriate dilution. The actual concentration is the calculated concentration multiplied by the dilution factor.

Typical data

As the OD values of the standard curve may vary according to the conditions of the actual assay performance (e.g. operator, pipetting technique, washing technique or temperature effects), the operator should establish a standard curve for each test. Typical standard curve and data is provided below for reference only.

Concentration(ng/mL)	800	400	200	100	50	25	12.50	0
OD	0.312	0.403	0.57	0.841	1.204	1.579	1.878	2.283



Precision

Intra-assay Precision (Precision within an assay): 3 samples with low, mid range and high level Cortisol were tested 20 times on one plate, respectively.

Inter-assay Precision (Precision between assays): 3 samples with low, mid range and high level Cortisol were tested on 3 different plates, 20 replicates in each plate.

Sample	Intra-assay Precision			Inter-assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	37.68	75.56	280.09	38.39	72.08	254.58
Standard deviation	2.54	4.47	13.08	2.38	3.65	12.14
C V (%)	6.74	5.92	4.67	6.20	5.06	4.77

Recovery

The recovery of Cortisol spiked at three different levels in samples throughout the range of the assay was evaluated in various matrices.

Sample Type	Range (%)	Average Recovery (%)
Serum (n=5)	91-103	96
EDTA plasma (n=5)	91-106	98
Cell culture media (n=5)	88-102	95

Linearity

Samples were spiked with high concentrations of Cortisol and diluted with Reference Standard & Sample Diluent to produce samples with values within the range of the assay.

		Serum (n=5)	EDTA plasma(n=5)	Cell culture media(n=5)
1:2	Range (%)	92-103	99-114	98-111
	Average (%)	97	106	105
1:4	Range (%)	87-99	96-111	101-113
	Average (%)	93	104	107
1:8	Range (%)	93-104	98-114	96-113
	Average (%)	99	105	103
1:16	Range (%)	85-99	97-113	103-114
	Average (%)	92	104	108

Troubleshooting

Problem	Causes	Solutions
Poor standard curve	Inaccurate pipetting	Check pipettes.
	Improper standard dilution	Ensure briefly spin the vial of standard and dissolve the powder thoroughly by gentle mixing.
	Wells are not completely aspirated	Completely aspirate wells in between steps.
Low signal	Insufficient incubation time	Ensure sufficient incubation time.
	Incorrect assay temperature	Use recommended incubation temperature. Bring substrate to room temperature before use.
	Inadequate reagent volumes	Check pipettes and ensure correct preparation.
	Improper dilution	
	HRP conjugate inactive or TMB failure	Mix HRP conjugate and TMB, rapid coloring.
Deep color but low value	Plate reader setting is not optimal	Verify the wavelength and filter setting on the Microplate reader.
		Open the Microplate Reader ahead to pre-heat.
Large CV	Inaccurate pipetting	Check pipettes.
High background	Concentration of target protein is too high	Use recommended dilution factor.
	Plate is insufficiently washed	Review the manual for proper wash. If using a plate washer, check that all ports are unobstructed.
	Contaminated wash buffer	Prepare fresh wash buffer.
Low sensitivity	Improper storage of the ELISA kit	All the reagents should be stored according to the instructions.
	Stop solution is not added	Stop solution should be added to each well before measurement.

SUMMARY

1. Add 50µL standard or sample to each well. Immediately add 50µL Biotinylated Detection Ab to each well. Incubate for 45 min at 37°C.
2. Aspirate and wash 3 times.
3. Add 100µL HRP Conjugate to each well. Incubate for 30 min at 37°C.
4. Aspirate and wash 5 times.
5. Add 90µL Substrate Reagent. Incubate 15 min at 37°C.
6. Add 50µL Stop Solution. Read at 450nm immediately.
7. Calculation of results.

Declaration

1. Limited by current conditions and scientific technology, we can't conduct comprehensive identification and analysis on all the raw material provided. So there might be some qualitative and technical risks for users using the kit.
2. The final experimental results will be closely related to the validity of products, operational skills of the operators and the experimental environments. Please make sure that sufficient samples are available.
3. To get the best results, please only use the reagents supplied by the manufacturer and strictly comply with the instructions!
4. Incorrect results may occur because of incorrect operations during the reagents preparation and loading, as well as incorrect parameter settings of the Micro-plate reader. Please read the instructions carefully and adjust the instrument prior to the experiment.
5. Even the same operator might get different results in two separate experiments. In order to get reproducible results, the operation of every step in the assay should be controlled.
6. Every kit has strictly passed QC test. However, results from end users might be inconsistent with our data due to some variables such as transportation conditions, different lab equipments, and so on. Intra-assay variance among kits from different batches might arise from the above reasons, too.



GLICOSE ENZIMÁTICA

INSTRUÇÕES DE USO

MÉTODO:

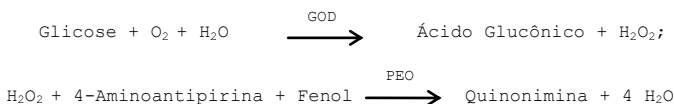
Teste Enzimático Colorimétrico para a determinação da Glicemia. Somente para uso diagnóstico *in vitro*. Com FCL (Fator clareante de Lípidos)

FINALIDADE:

Kit para a determinação quantitativa da Glicose em soro, plasma, líquido e urina.

FUNDAMENTO:

A enzima glicose oxidase (GOD) no reagente em presença de oxigênio, catalisa a oxidação da glicose presente na amostra do paciente, o que leva a formação de peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase (PEO) também presente no reagente, catalisa a reação de oxidação do fenol pelo peróxido de hidrogênio em presença de 4-aminoantipirina, formando um composto violáceo com absorção máxima em 505nm. A concentração desse composto (quinonimina) e consequentemente a intensidade da cor são diretamente proporcionais a concentração de colesterol na amostra.



SIGNIFICADO CLÍNICO:

Níveis elevados de glicose estão associados a diversas condições clínicas. A hiperglicemia pode ser resultante de ausência na secreção da insulina ou estar associada a outras doenças endócrinas. A elevação da glicose também pode estar associada ao uso de fármacos que podem reduzir ou bloquear a liberação da insulina.

A dosagem de glicose é de grande importância para o diagnóstico e monitoramento do Diabetes Mellitus, bem como no diagnóstico das acidoses metabólicas, hipoglicemias e desidratações.

O Diabetes Mellitus é uma condição clínica crônica caracterizada pela elevação da glicemia e glicosúria. Indivíduos diabéticos, apresentam maior risco para o desenvolvimento de cegueira, doenças cardíacas e renais. A diabetes pode ser dividida em Tipo I ou insulino-dependente e Tipo II ou não dependente de insulina.

Nível reduzido de glicose é uma característica da hipoglicemia. Essa redução da glicose plasmática pode estar relacionada a várias condições clínicas como neoplasias, doença hepática grave, hipoglicemia alimentar, alcoolismo, etc.

A presença de glicose na urina depende da hiperglicemia atingir níveis elevados, que ultrapassem o limiar de reabsorção tubular renal. O limiar renal apresenta maior importância na glicosúria renal, que pode ser congênita ou adquirida.

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES:

Conservar entre 2 a 8 °C.

R1 - ENZIMÁTICO: Tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,5), 4-aminoantipirina 0,3 mmol/L, fenol 10 mmol/L, peroxidase > 1,5 KU/L, GOD > 15 KU/L.

R2 - PADRÃO: Solução de Glicose 100 mg/dL.

ESTABILIDADE:

O Reagente Enzimático e o Padrão estão prontos para uso, não é necessário preparar os reagentes. Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo, quando armazenados a temperatura de 2 a 8 °C, bem vedados e se for evitada a contaminação durante o uso. Após aberto o frasco, o reagente é estável por 12 semanas quando armazenado entre 2 a 8 °C, e por 2 semanas entre 15 e 25 °C.

TRANSPORTE:

O kit não é afetado pelo transporte desde que seja entregue ao destinatário no período máximo de 07 dias e em uma temperatura de até 37 °C.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:

O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado sob as condições de temperatura descritas acima e em sua embalagem original.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS:

- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes. Não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele e mucosa;
- Recomendamos a aplicação das Boas Práticas de Laboratórios Clínicos para a execução dos testes;
- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes;
- Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugerimos utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental;
- Não misturar reagentes de lotes diferentes ou trocar as tampas, evitando assim, contaminação cruzada.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:

- Espectrofotômetro UV/VIS;
- Tubos e pipetas;
- Banho-maria ou termostático na temperatura constante de 37 °C;
- Cronômetro;

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

• SORO E PLASMA (fluoreto)

O soro e o plasma devem ser separados até 30 minutos após a coleta para evitar a glicólise. Se armazenado sob refrigeração 2 a 8 °C, a glicose é estável por até 24 horas.

• URINA

Utilizar amostra de 24 horas. Acondicionar em frasco fechado e manter sob refrigeração de 2 a 8 °C. A amostra deve ser centrifugada e o sobrenadante utilizado nas análises. A glicose na urina é estável por até 6 horas.

• LÍQUOR

A dosagem deve ser realizada imediatamente após a coleta. Se não for possível, centrifugar a amostra e armazenar o sobrenadante de 2 a 8 °C por até 24 horas.

INTERFERÊNCIAS

Citrato, EDTA, Heparina e Oxalato podem produzir resultados falsamente diminuídos. Não devem ser utilizados soros icterícios. Amostras com Triglicérides até 1000 mg/dL,

hemoglobina até 200 mg/dL e ácido ascórbico até 5 mg/dL não interferem no teste.

PROCEDIMENTO DO TESTE

1. Observações

- O nível de água no banho-maria deve ser superior ao dos reagentes nos tubos;
- A observação minuciosa da limpeza e secagem da vidraria, da estabilidade dos reagentes, da pipetagem, da temperatura e do tempo de reação são de extrema importância para se obter resultados precisos e exatos;
- A água utilizada nos laboratórios clínicos deve ser purificada utilizando-se métodos adequados para as finalidades de uso. Colunas deionizadoras saturadas liberam diversos íons, amins e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

2. Termostatar o reagente

Ajustar a temperatura do banho-maria ou termostático para 25 °C ou 37 °C. A temperatura deve permanecer constante durante a realização do teste.

3. Leitura do teste

Comprimento de onda: 500 nm, Hg 546 nm;

Cubeta: 1 cm;

Temperatura: 37 °C;

Medição: Zerar a absorbância contra branco. É necessário apenas um branco por bateria de testes.

4. Procedimento

Pipetar na cubeta	Branco	Amostra/padrão
Amostra ou Padrão	---	10µL
R1 - Enzimático	1000µL	1000µL

O reagente deve ser homogeneizado e imediatamente incubado por 10 minutos a 37 °C. A absorbância deve ser lida dentro de 60 minutos contra o reagente branco.

5. Cálculos:

Glicose (mg/dL) = $\frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times \text{Concentração Padrão}$

Fator de Calibração (FC) = $\frac{\text{Concentração do Padrão (mg/dL)}}{\text{Absorbância do Padrão}}$

Glicose (mg/dL) = Absorbância da Amostra x FC

5.1 Exemplo com Padrão

Concentração do Padrão: 100 mg/dL

Absorbância da Amostra: 0,204

Absorbância do Padrão: 0,302

Glicose (mg/dL) = (0,204/0,302) x 100 = 67,6 mg/dL

5.2. Exemplo com Fator de Calibração

Fc = 100/0,302 = 331

Glicose (mg/dL) = 331 x 0,204 = 67,5mg/dL

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

1. Linearidade da reação:

A linearidade do método é de até 500mg/dL. Para amostras com concentrações mais elevadas, diluir em 1 + 2 com solução salina a 0,9% e repetir a determinação. Multiplicar o resultado por 3.

2. Valores de referência

Amostra	Valor (mg/dL)	Interpretação
Soro/Plasma (jejum de 8 horas)	70 - 99 mg/dL	Glicemia jejum normal
	100 - 125 mg/dL	Glicemia jejum alterada
	> 125 mg/dL	Provável Diabetes Mellitus
Recém-nascidos	30 a 80 mg/dL	Normal
Prematuros	20 a 50 mg/dL	Normal
Líquor	40 a 75 mg/dL	Normal
Urina	< 20 mg	Normal
Urina de 24h	< 250 mg/dL	Normal

Estes valores devem ser utilizados como orientação. É recomendado que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

3. Sensibilidade

0,604mg/dL

4. Comparação de métodos

O kit para a dosagem de Glicose foi comparado com outros kits comercialmente disponíveis. Amostras diversas foram utilizadas na comparação dos testes dentre essas soros controle e amostras de pacientes. Os resultados obtidos mostraram boa concordância.

5. Repetibilidade e reprodutibilidade

Foram utilizados soros controle comercialmente disponíveis para a avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade do kit. Os soros foram reconstituídos e/ou preparados seguindo as recomendações do fabricante. Trinta determinações dos soros controle foram realizadas com o kit de Glicose da VIDA Biotecnologia para a determinação da repetibilidade e 10 determinações por soro controle para a reprodutibilidade. As médias das determinações foram calculadas e comparadas com os valores alvo.

5.1 Repetibilidade

Soro Controle	N	Média dos valores obtidos	DP	CV
SC1	30	53,50	0,765	1,43
SC2	30	112,73	2,876	2,55
SC3	30	386,12	11,323	2,93

5.2 Reprodutibilidade

Soro Controle	N	Média dos valores obtidos	DP	CV
SC1	10	56,30	0,873	1,55
SC2	10	109,34	2,782	2,54
SC3	10	382,89	12,092	3,16

6. Controle de qualidade

Foram utilizados soros controle comercialmente disponíveis para a avaliação do kit. Os soros foram reconstituídos e/ou preparados seguindo as recomendações do fabricante. Dez determinações dos soros controle foram realizadas com o kit de Glicose da VIDA Biotecnologia. As médias das determinações foram calculadas e comparadas com os valores alvo.

Soro Controle	Valor alvo	Média dos valores obtidos	% de Recuperação
SC1	211	208,34	98,73
SC2	302	300,21	99,41
SC3	283	286,34	101,18

Todo soro controle com valores determinados para Glicose, pelo método enzimático-colorimétrico, pode ser utilizado.

APRESENTAÇÃO DO KIT

CATÁLOGO	REAGENTE	VOLUME	NÚMERO DE DETERMINAÇÕES
100/410-500	R1 - ENZIMÁTICO	2 X 250 mL	500
	R2 - PADRÃO	1 x 3 mL	
100/410-1000	R1 - ENZIMÁTICO	2 X 500 mL	1000
	R2 - PADRÃO	1 x 3 mL	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Trinder, P. Determination of Glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. V.6, p.24-27, 1969.

2- Schettler, G. And Nussel; . Arb. Med Soz. Med. Parv. Med. 10, 25, 1975.

3- BARHAM D.; TRINDER P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by oxidase system. Analyst v.27, p.142-145, 1972.

4- YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2, 5 ed. Washington DC: AACC Press, 2000.

5- WESTGARD, J. O. et al. A multi-rule shewhart chart quality control in clinical chemistry. Clin. Chem. v.27 p.493-501, 1981.

INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR:

A VIDA Biotecnologia garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nessa instrução sejam seguidos corretamente.

Nº DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO, DATA DE VALIDADE VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

PRODUZIDO E DISTRIBUÍDO POR: VIDA Biotecnologia

CNPJ:11.308.834/0001-85















Avenida José Cândido da Silveira 2100 - Horto Florestal - CEP 31035-536; Belo Horizonte. Minas Gerais - www.vidabiotecnologia.com.br

Departamento de Serviços Associados | (31)34663351; dsa@vidabiotecnologia.com.br

Resp Técn.: Renato Silva CRBIO4 - 57360/04-D

Reg. M.S.: 80785070040

Rev.: 02/2016

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NO RÓTULO DO PRODUTO	
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data limite de utilização do produto (dd/mm/aaaa)
	Material Calibrador
	Limite de temperatura (conservar a)
	Consultar instruções de uso
	Código do Produto
	Produto para Diagnóstico In Vitro
	Liofilizado
	Corrosivo
	Risco Biológico
	Tóxico
	Reagente
	Data de Fabricação (mm/aaaa)
	Número de Lote