



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELA KAIZER TERTO

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO E DO  
EUGENOL NO BEM-ESTAR ANIMAL DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*)**

---

Londrina  
2021

DANIELA KAIZER TERTO

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO E DO  
EUGENOL NO BEM-ESTAR ANIMAL DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra<sup>a</sup>. Prof<sup>a</sup>. Ana Maria Bridi

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração

TERTO, DANIELA KAIZER.

INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO E DO EUGENOL NO  
BEM-ESTAR ANIMAL DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) / DANIELAKAIZER  
TERTO. - Londrina, 2021.

56 f.

Orientador: Ana Maria Bridi.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Métodos de insensibilização e bem-estar animal de tilápia - Tese. I. Bridi, Ana  
Maria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636

DANIELA KAIZER TERTO

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO E DO  
EUGENOL NO BEM-ESTAR ANIMAL DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Orientadora: Ana Maria Bridi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Rodrigues de Souza  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Campagnoli de  
Oliveira Filho  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
- UFRPE

Londrina, 19 de fevereiro de 2021.

## AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento prioritário é para **Deus e Nossa Senhora**, que me guiaram pelo caminho correto, me mantendo em pé, com fé e perseverança no meu propósito, me fazendo chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, **Cleide Moreira Kaizer e Sérgio Vieira Terto**, por acreditarem no meu sonho, por toda dedicação física, financeira e emocional para torná-lo realidade. Sempre trabalhando muito, não mediram esforços para me ajudar.

Ao meu irmão **Fernando Terto**, a minha sobrinha **Manuelle Oliveira Terto** e ao meu sobrinho/afilhado **Augusto César Fernandes Terto** (meu filho de coração) por todo amor que me fortaleceu nesta caminhada.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ana Maria Bridi**, fonte de inspiração por tamanha inteligência e dedicação ao que faz.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. **Rafael Humberto de Carvalho**, que me ajudou constantemente para realização deste trabalho.

Em especial a minha banca. Muito obrigada Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Maria Luiza Rodrigues de Souza** e Prof. Dr. **Paulo Roberto Campagnoli de Oliveira Filho**, vocês são fonte de inspiração e admiração.

Ao **GPAC** (Grupo de Pesquisa e Análise de Carne), e todos os integrantes desse grupo, que se tornaram minha família da faculdade. Em especial ao pessoal da pós-graduação: **Amanda Barro, Edmara Correia, Évelyn Rangel, Guilherme Agostinis, Jéssica Vero e Victor Furlan**.

Meu sincero agradecimento ao meu noivo **Fábio Pelisson**, por toda ajuda, principalmente neste trabalho, o qual ele quem concedeu os animais para o experimento, além de apoio emocional e incentivo. Agradeço à sua família, que me acolheu como membro e me amparou sempre que necessário. Obrigada **Ilza Pelisson, Maurício Pelisson, Renata Pelisson, Patrício de Castro, João Arthur Pelisson de Castro e Gabriel Pelisson de Castro**.

Gostaria de agradecer a Prof. Dr<sup>a</sup> **Juliana Delatim**, e a sua orientada de mestrado, **Vanessa Bezerra** por toda disponibilidade e ajuda nas análises que fiz em seu laboratório, serei eternamente grata.

Ao meu amigo que a estatística me proporcionou – **Jansller Luiz**. Muito obrigada por toda ajuda, atenção, paciência e ensinamentos.

Aos meus amigos **Gabriela Nagi e Elias Cavalheiro**, que tornaram essa

caminhada mais leve.

A **Universidade Estadual de Londrina**, e ao programa de **Ciência Animal** pela oportunidade.

A **CNPq** pela concessão da bolsa.

TERTO, Daniela Kaizer. **Influência dos métodos de insensibilização e do eugenol no bem-estar animal de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

O método de insensibilização a ser empregado no manejo pré-abate de animais é importante porque além de garantir o bem-estar, exerce influência nas características sensoriais, nutritivas e conseqüentemente no tempo de vida útil deste alimento. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos métodos de insensibilização por eletronarcore, secção medular e termonarcore, com a utilização ou não de um anestésico natural, o eugenol, no bem-estar animal da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizadas 150 tilápias linhagem premium divididos em seis tratamentos, sendo 25 animais para cada tratamento. O delineamento foi completamente casualizado em esquema fatorial 3x2 (três métodos de insensibilização e uso ou não de eugenol). Para verificação da eficácia dos métodos foram avaliadas respostas comportamentais de natação, equilíbrio, resposta ao estímulo e reflexo do vestibulo-ocular (VOR). Após, coletou-se sangue para análises de glicose e lactato. Os animais foram abatidos por secção dos arcos branquiais, em seguida foram filetados e separada amostras para análises de valor de R, glutathiona redutase e catalase. Os dados foram avaliados com o auxílio do programa software R 4.0.2 (R Core Team, 2020). O grupo de animais que foram anestesiados com eugenol antes do atordoamento registou um maior número de animais atordoados do que no grupo que não foi tratado com o composto. Com base nas análises comportamentais, o grupo sujeito à eletronarcore registou o maior número de animais não insensibilizados, o maior valor de lactato no grupo tratado com eugenol, o início mais rápido do rigor mortis, maior concentração de glutathiona, e maior atividade catalítica, em comparação com os valores correspondentes nos outros grupos. O grupo atordoadado por secção medular apresentou níveis elevados de lactato para os animais que não foram tratados com eugenol, e o grupo atordoadado por termonarcore apresentou valores elevados de glicose, independentemente da utilização de eugenol. A utilização do eugenol foi eficaz na avaliação dos parâmetros comportamentais da tilápia. No entanto, à semelhança de estudos anteriores sobre a eficácia de métodos atordoantes na redução do stress causado a estes animais, não observámos a ausência completa de stress em nenhum dos métodos. A eletronarcore foi o método que atingiu o nível mais elevado de stress. Recomenda-se estudos mais específicos para os métodos de secção medular e termonarcore, a fim de gerar menor tempo de exposição, respeitando sua fisiologia, reduzindo ao máximo o estresse ocasionado no momento pré-abate.

**Palavras-chave:** eletronarcore; insensibilização; secção medular; termonarcore.

TERTO, Daniela Kaizer. **Influence of stunning methods and eugenol on the welfare of tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2020. 57 p. Dissertation (master's in animal science) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

The stunning method to be used in the pre-slaughter handling of animals is important because besides guaranteeing the well-being, it influences the sensory and nutritional characteristics, and consequently the shelf life of the food. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of stunning methods by electronarcosis, medullary section, and thermonarcosis, with or without the use of a natural anesthetic, eugenol, on the animal welfare in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). A total of 150 tilapia of the premium strain were used, divided into six treatments, with 25 animals for each treatment. The design was completely randomized in a 3x2 factorial scheme (three stunning methods and the use or not of eugenol). To verify the efficacy of the methods, behavioral responses of swimming, balance, response to stimulus, and vestibulo-ocular reflex (VOR) were evaluated. Afterwards, blood was collected for glucose and lactate analyses. The animals were slaughtered by sectioning the gill arches, then filleted and samples were separated for R-value, glutathione reductase, and catalase analyses. Data were evaluated using the software program R 4.0.2 (R Core Team, 2020). The group of animals that were anesthetized with eugenol prior to stunning recorded a higher number of stunned animals than in the group that was not treated with the compound. Based on the behavioral analyses, the group subjected to electronarcosis recorded the highest number of unstunned animals, the highest lactate value in the eugenol-treated group, the fastest onset of rigor mortis, higher glutathione concentration, and higher catalase activity, compared to the corresponding values in the other groups. The group stunned by medullary section showed elevated lactate levels for the animals that were not treated with eugenol, and the group stunned by thermonarcosis showed elevated glucose values, regardless of the use of eugenol. The use of eugenol was effective in assessing the behavioral parameters of tilapia. However, similar to previous studies on the effectiveness of stunning methods in reducing the stress caused to these animals, we did not observe complete absence of stress in any of the methods. Electronarcosis was the method that achieved the highest level of stress. More specific studies are recommended for the methods of medullary section and thermonarcosis, in order to generate less exposure time, respecting their physiology, reducing as much as possible the stress caused in the pre-slaughter moment.

**Key-words:** eletronarcosis; stunning; medullar section; thermonarcosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Protocol for observing self-initiated behavior, stimulus-response, and clinical reflex post-stunning .....	53
---	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Frequency of insensitized (score 1) and non-insensitized (score 2) tilapia with respect to their swimming, balance, response to stimulus, and vestibulo-ocular reflex (VOR) behaviors in each of the three stunning methods, with and without the use of eugenol .....54
- Tabela 2** – Mean values of biochemical variables [glucose, lactate, rigor mortis (R-value), and glutathione (GSH) reductase] with respect to the interaction between the stunning method and eugenol treatment in tilapia .....55
- Tabela 3** – Average catalase values in the tilapia with respect to the different stunning methods, with and without the use of eugenol .....56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina-5´-trifosfato
CAT	Catalase
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
GSH	Glutathiona Redutase
GSSG	Glutathiona Oxidada
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ROS/EROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
TBARS	Substâncias Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico
VOR	Reflexo vestibulo-ocular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
3.1	TILAPICULTURA .....	17
3.2	MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO .....	18
3.2.1	Eletronarcose .....	19
3.2.2	Secção Medular .....	20
3.2.3	Termonarcose .....	20
3.2.4	Eugenol .....	21
3.3	BEM-ESTAR ANIMAL E ABATE HUMANITÁRIO .....	22
3.3.1	Avaliação do Método de Insensibilização .....	23
3.3.2	Avaliação do Plasma Sanguíneo .....	23
3.3.3	Valor de R .....	25
3.3.3	Defesas Antioxidantes .....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1: EFICÁCIA DO USO DE EUGENOL E DE DIFERENTES MÉTODOS NA INSENSIBILIZAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO</b> .....	<b>34</b>
	ABSTRACT .....	34
	INTRODUÇÃO .....	36
	MATERIAL E MÉTODOS .....	37
	RESULTADOS .....	41
	DISCUSSÃO .....	43
	CONCLUSÃO .....	47
	REFERÊNCIAS .....	47
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>57</b>

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 A piscicultura está cada vez mais se destacando dentre todas as culturas  
3 de produção animal. No ano de 2019 a produção brasileira avançou em 4,9%  
4 comparada com o ano anterior, produzindo 758.006 toneladas de peixes. Deste  
5 montante, a tilápia é a espécie que mais se destaca, representando 57% da  
6 piscicultura nacional. O Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial de  
7 produção de tilápias com 423.149 toneladas, perdendo apenas para China (1,93  
8 milhões de toneladas) que lidera essa colocação, seguida da Indonésia (1,35  
9 milhões de toneladas) e do Egito, com 900 mil toneladas. O Paraná por sua vez,  
10 lidera a posição nacional, onde, em 2019 sua produção foi equivalente a 146.212  
11 toneladas (PeixeBR, 2020).

12 Apesar dessa vasta produtividade, essa atividade ainda necessita passar  
13 por alguns obstáculos para se consolidar e atingir seu máximo potencial. Um  
14 fator que precisa ser aprimorado é o momento que antecede o abate desses  
15 animais, pensando no seu bem-estar e conseqüentemente na qualidade da  
16 carne dos pescados (RIBAS et al., 2007). Comparado aos demais animais de  
17 criação zootécnica, ainda não existem normativas específicas que priorizam o  
18 bem-estar e a qualidade da carne dos peixes durante o processo de  
19 insensibilização e abate. Sendo assim, na piscicultura, essa prática normalmente  
20 é escolhida conforme a facilidade de execução e a redução de custos  
21 (PEDRAZZANI, 2007).

22 Entretanto, para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a  
23 Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos (EFSA), essa atividade já  
24 é uma preocupação eminente, de forma que passaram a incluir peixes em suas  
25 diretivas e recomendações sobre o bem-estar dos animais, a nível mundial ou  
26 de União Européia sobre como manejar, atordoar e abater peixes na aquicultura  
27 (EFSA, 2009; OIE, 2018).

28 Segundo Freire e Gonçalves (2013) e Roob (2000) os métodos de abate  
29 podem influenciar na preservação das características do alimento. A ausência  
30 da insensibilização pode fazer com que o animal se agite incansavelmente  
31 fazendo com que as reservas de energia sejam diminuídas rapidamente gerando  
32 o acúmulo de ácido láctico, favorecendo a ação de enzimas proteolíticas, além,  
33 de interferirem diretamente na qualidade do produto.

34 Uma alternativa para o manejo pré-abate, comumente utilizada para fins  
35 de manejo, como transporte ou imobilidade para vacinação e cirurgia, seria a  
36 utilização de anestésicos. Esse procedimento objetiva sedar levemente os  
37 animais aquáticos, de maneira reversível, deprimindo seu sistema nervoso  
38 central e periférico (JAVAHERY et al., 2012). Vários anestésicos estão  
39 disponíveis para peixes atualmente. Entre os mais utilizados está o eugenol,  
40 composto derivado do óleo de cravo, que possui maior eficiência em uma  
41 variedade de temperaturas, disponibilidade e baixo custo, além de garantir maior  
42 segurança para os peixes e para os manipuladores (JAVAHERY et al., 2012).

43 Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos métodos  
44 de insensibilização por eletronarcore, golpe percussivo, secção medular e  
45 termonarcore comparando com a utilização ou não de um anestésico natural, o  
46 eugenol, no bem-estar e na qualidade de carne da tilápia do Nilo (*Oreochromis*  
47 *niloticus*).

## 48 2 OBJETIVOS

### 49 2.1 OBJETIVO GERAL

50

51 Avaliar os efeitos dos métodos de insensibilização por eletronarcose,  
52 secção medular e termonarcose associados à utilização ou não de um  
53 anestésico natural (eugenol) sobre o bem-estar animal de tilápias.

54

### 55 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

56

- 57 ▪ Analisar a eficácia dos métodos de insensibilização e do eugenol;
- 58 ▪ Mensurar níveis de indicadores de estresse no plasma sanguíneo;
- 59 ▪ Mensurar influência dos métodos de insensibilização e eugenol na  
60 atividade das enzimas antioxidantes no filé;

61

## 62 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 63 3.1 TILAPICULTURA

64 Alguns registros históricos mostram que a tilápia já era cultivada pelos  
65 egípcios cerca de 4.000 anos a.C., tendo como origem o continente africano,  
66 mais especificamente o rio Nilo e o lago Vitória. De acordo com a historiografia  
67 da piscicultura mundial, a tilápia detém aproximadamente 70 espécies e  
68 subespécies distribuídas nos gêneros: *Petrotilapia*, *Tilapia*, *Sarotherodon* e  
69 *Oreochromis* (ANIMAL BUSINESS, 2019).

70 Devido a sua alta adaptabilidade e aclimatação se expandiu por todos os  
71 continentes, chegando no Brasil em 1950, onde foi trazida experimentalmente,  
72 por uma hidroelétrica de São Paulo, a variedade Tilápia rendalli. Apenas em  
73 1996, que de fato chegou a *Oreochromis niloticus*, geneticamente melhorada, e  
74 adaptada ao clima do nosso país. Onde durante o passar dos anos ganhou seu  
75 espaço e nenhuma outra espécie conseguiu acompanhar sua alta produtividade.  
76 Após 50 anos houve outra importação da tilápia do Nilo (*Oreochromis sp*), com  
77 o intuito de peixamento dos grandes açudes da região do Nordeste. (ANIMAL  
78 BUSINESS, 2019).

79 Segundo a Peixe-BR, estima-se que nos próximos dez anos a busca por  
80 peixes de cultivo aumente, tanto no mercado interno, quanto externo, tendo a  
81 tilápia como seu carro chefe, pois é ela quem lidera o ranking mundial de peixes  
82 de cultivo (PeixeBR, 2019). O que pode ser explicado devido a sua  
83 adaptabilidade ao clima, rusticidade da espécie, aceitação de diferentes  
84 sistemas de produção, grande demanda do produto, bons resultados na criação  
85 intensiva, além de versatilidade na culinária (EMBRAPA, 2017).

86 Em relação a produção mundial dessa espécie, a China ocupa o primeiro  
87 lugar, produzindo 1,93 milhão de toneladas em 2019, em seguida temos a  
88 Indonésia com 1,35 milhão de tonelada, o Egito com 900.000 toneladas, e o  
89 Brasil ocupando a quarta colocação produzindo 432.149 toneladas. Estima-se  
90 que a produção nacional em 2020 seja de 460 mil toneladas (PeixeBR, 2020).

91 A tilápia está presente em todas as regiões do Brasil, sendo o Paraná seu  
92 maior produtor, no qual em 2019 produziu 146.212 toneladas. Essa posição foi  
93 alcançada por meio de consistentes investimentos realizados pela agroindústria

94 paranaense, além de infraestrutura funcional, boa logística e foco em produtos  
95 de alto valor agregado. São Paulo ocupa a segunda posição com 64.900  
96 toneladas, Santa Catarina 38.550 toneladas, Minas Gerais 36.350 e  
97 Pernambuco 25.421 toneladas (PeixeBR, 2020). Em 2019, a tilápia também foi  
98 o peixe de cultivo mais exportado do Brasil, exportando pouco mais de 5.000  
99 toneladas, em termos de volume, comparando com o ano de 2018 houve um  
100 aumento de 19% (PeixeBR, 2020).

101

### 102 3.2 MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO

103 A insensibilização antes do processo de abate é importante, pois, reduz o  
104 sofrimento do animal por um longo período, uma vez que reduz o medo e a dor.  
105 Além disso, quando o animal passa por um processo que preconiza seu bem-  
106 estar, conseqüentemente há uma melhora na qualidade do produto final,  
107 evitando por exemplo que as reações bioquímicas do *rigor mortis* sejam iniciadas  
108 rapidamente (LINES et al., 2003).

109 O processo de abate para peixes deve ser realizado em duas fases. Na  
110 primeira, os animais são insensibilizados e na segunda, sacrificados (o que pode  
111 ser realizado por diferentes métodos). Esses processos podem ser realizados  
112 juntos ou separadamente. Porém, o tempo de atordoamento até a morte, deve  
113 ser o menor possível, de forma que o animal não readquira a consciência (LINES  
114 et al., 2003).

115 Segundo Caggiano (2002), um abate deve ser rápido, fácil e higiênico,  
116 de forma que cause menor prejuízo possível à integridade do animal e da carne.  
117 Baseando-se em estudos anatômicos, fisiológicos e comportamentais, notou-se  
118 que os peixes são muito similares às aves e mamíferos, evidenciando assim, sua  
119 capacidade em sentir medo e dor. Faze -se necessário então, normativas que  
120 aspiram o bem-estar desses animais no momento do seu sacrifício (LAMBOOIJ  
121 et al., 2002; LAMBOOIJ et al., 2006).

122 Ainda não existe nenhuma normativa que rege sobre a insensibilização e  
123 abate desses animais. No Brasil, nem a portaria nº 3 de 17 de janeiro de 2000 e  
124 nem a consulta pública portaria nº 62, de 10 de maio de 2018, que fazem menção  
125 sobre o regulamento técnico de manejo pré-abate e abate humanitário não  
126 incluem peixes e/ou pescados nas suas diretrizes (BRASIL, 2000; BRASIL,

127 2018). De forma que a escolha do método utilizado para insensibilizar e abater  
128 esses animais é definida conforme seu custo e facilidade de implementação na  
129 linha de abate (PEDRAZZANI et al., 2007).

130 Uma das poucas recomendações disponíveis, é o Código de Animais  
131 Aquáticos, criado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), e adaptado  
132 pelo MAPA (Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento), que  
133 preocupada com o bem-estar desses animais passou a incluir peixes em suas  
134 diretivas e recomendações a nível mundial, estabelecendo orientações  
135 principalmente sobre o transporte, insensibilização e abate (OIE, 2018).  
136 Entretanto, não há nenhuma orientação específica de atordoamento e abate  
137 para espécies, tamanho, peso ou idade. Sua única indicação é que os métodos  
138 mecânicos e elétricos podem ser utilizados tanto para insensibilização, quanto  
139 para o abate, enquanto os métodos de resfriamento com gelo, asfixia por dióxido  
140 de carbono, banhos de sal ou amônia são considerados apenas como formas de  
141 abate direto, sem insensibilização prévia. (OIE, 2018).

142 De acordo com Viegas et al., (2012), os métodos mais utilizados no Brasil,  
143 tais como termonarçose, eletronarçose e asfixia não são considerados como  
144 humanitários, pois provocam sofrimentos desnecessário, estresse e acabam  
145 minimizando a qualidade do produto durante o armazenamento. Para Wolffrom  
146 e Santos (2014), apenas a insensibilização por secção medular, pode ser uma  
147 alternativa de abate humanitário. Porém, mais estudos são necessários para  
148 especificar qual melhor método de insensibilização para determinada espécie de  
149 peixe, preconizando o bem-estar e qualidade do produto.

150

### 151 3.2.1 Eletronarçose

152 O atordoamento elétrico se baseia principalmente em passar uma  
153 corrente elétrica na água ou diretamente no corpo do animal, até perder a  
154 consciência completa (VAN DE VIS et al., 2003). Segundo Nordgreen et al.  
155 (2008) a insensibilização através da eletronarçose pode ser considerado um  
156 método humanitário no fluxograma de abate, devido ao fato de ser um método  
157 rápido e causar, aparentemente, menor sofrimento em relação às demais  
158 técnicas. Além de ter como vantagem a manipulação conjunta de grandes lotes  
159 de peixes (EFSA, 2009).

160 No entanto, não existem muitos estudos que indiquem um padrão para as

161 variáveis de voltagem, de intensidade da corrente e de tempo de exposição para  
162 cada espécie de peixe (NORDGREEN et al., 2008). Desta forma, são  
163 necessários mais estudos que comprovem a sua eficácia, a fim de prevenir o  
164 estresse ao animal, além de alguns efeitos indesejáveis no músculo, ruptura de  
165 ossos e hemorragias que podem ocorrer durante a prática de insensibilização  
166 (KNOWLES et al., 2008).

167

### 168 3.2.2 Secção Medular

169 Esta prática de insensibilização consiste em introduzir uma faca, uni ou  
170 bilateral, bem afiada, por um dos opérculos do peixe, até atingir a medula  
171 espinhal (PEDRAZZANI et al., 2007). Para Wolffrom e Santos (2014), a  
172 insensibilização por secção de medula, pode ser uma alternativa de abate  
173 humanitário, pois se for aplicada com precisão, a técnica leva o peixe à  
174 inconsciência imediata. Estudos feitos por pesquisadores da Universidade  
175 Federal do Paraná, concluíram que o método de secção de medula causou a  
176 inconsciência de tilápia do Nilo com 82 segundos em média, enquanto o choque  
177 térmico demorou 750 segundos (PEDRAZZANI et al., 2007).

178 Do ponto de vista do bem-estar animal, quando comparado a secção  
179 medular com a decapitação, a primeira técnica é considerada preferível, pois  
180 envolve menor quantidade de lesão tecidual (WOLFFFROM; SANTOS, 2014).  
181 Segundo Pedrazzani et al. (2007), este método provoca maior insensibilidade a  
182 dor no animal, além de atingir *rigor* completo entre 8 e 11 horas, mantendo assim  
183 os padrões de qualidade das proteínas do pescado.

184

### 185 3.2.3 Termonarçose

186 É um dos métodos mais utilizados, que consiste na imersão do peixe  
187 (clima tropical) em água gelada (ASHLEY, 2007) a uma temperatura de cerca de  
188 1 °C. A hipotermia causa insensibilização nos animais, o que acaba sendo  
189 utilizado em trabalhos que avaliam tanto questões de bem-estar dos peixes,  
190 quanto sua relação com a qualidade do produto (LAMBOOIJ et al., 2002).

191 No entanto, esta prática pode oscilar muito na quantidade de tempo ideal  
192 até deixar os peixes inconscientes (LYMBERG, 2002). Mantendo os peixes vivos  
193 por horas, por serem pecilotérmicos, ocasionando exaustão dos mesmos  
194 (HASTEIN et al., 2005). Portanto, o choque térmico é um método questionável

195 do ponto de vista do bem-estar animal (ROBB et al., 2000; CONTE, 2004).

196 Lambooij et al. (2006) observaram que a adição de água e gelo, com a  
197 temperatura passando de 24 °C para 1 °C nos tanques de cultivo de bagre  
198 africano (*Clarias gariepinus*) causou movimentos de fuga e aumento nos  
199 batimentos cardíacos antes da insensibilização, sendo, portanto, um método  
200 estressor para esta espécie de peixe. Em climas quentes, quando os peixes são  
201 imersos em água e gelo o choque térmico pode causar imobilidade e aparente  
202 insensibilidade (LINES et al., 2003).

203

#### 204 3.2.4 Eugenol

205 Para evitar o estresse durante o manejo na aquicultura, como por exemplo  
206 durante biometria, vacinação, desova, coleta de sangue, transporte, quanto em  
207 pesquisas, utilizam-se de anestésicos com o intuito de prevenir lesões físicas e  
208 redução no metabolismo (MARICCHIOLO; GENOVESE, 2011 ; JAVAHERY et  
209 al., 2012). O anestésico disperso na água é absorvido pelas brânquias, difunde-  
210 se para o sangue e atinge o sistema nervoso central (SNC) (ROSS; ROSS,  
211 2008). O efeito é geralmente avaliado pelo tempo de indução e recuperação da  
212 anestesia, a resposta reflexa a estímulos externos e a capacidade de responder  
213 à manipulação (SMALL, 2003; ZAHL et al., 2012).

214 De acordo com o estudo de Ross e Ross (2008), os anestésicos gerais  
215 causam depressão sistêmica do sistema nervoso central devido aos seus efeitos  
216 nos axônios nervosos, liberação do transmissor ou excitabilidade da membrana  
217 ou uma combinação desses efeitos. O mecanismo de ação dos anestésicos  
218 inclui: (1) Estabilizar a propagação de impulsos nervosos em axônios aferentes  
219 e / ou eferentes, (2) Prevenir a liberação de neurotransmissores na membrana  
220 pré-sináptica e (3) Bloqueio competitivo de sítios receptores na membrana pós-  
221 sináptica.

222 O eugenol é um dos anestésicos mais utilizados na insensibilização de  
223 peixes, pois apresenta baixos riscos de toxicidade e mortalidade para o animal,  
224 (ROUBACH et al., 2015), além do seu baixo custo e  
225 abundância (MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011; JAVAHERY et al., 2012).

226 Yousefi et al. (2019) afirmaram que os peixes tratados com linalol  
227 apresentaram níveis de cortisol significativamente mais altos do que os tratados  
228 com eugenol. Maricchiolo e Genovese (2011) e de Oliveira et

229 al. (2019) relataram que eugenol não afetou os níveis de cortisol e glicose em  
230 peixes; os níveis de cortisol foram inferiores ao controle em *Carassius*  
231 *auratus* exposto a óleo de cravo , conforme relatado por Le et al. (2019).

232

### 233 3.3 BEM- ESTAR ANIMAL E ABATE HUMANITÁRIO

234 O bem-estar dos peixes está relacionado à falta de fome e sede,  
235 desconfortos, dores, lesões, medos e sofrimento mental, além de possuírem  
236 liberdade para expressar seu comportamento normal (ASHLEY, 2007). A  
237 literatura científica traz como base consensual de que peixes possuem a  
238 capacidade de sofrer e estar em desconforto. Desta forma, se torna necessário  
239 considerar o bem-estar desses animais em todas as condições de cultivos  
240 (BARCELLOS, 2004), principalmente no momento que antecede seu abate,  
241 momento esse onde os animais são expostos a maiores estressores, como  
242 despesca, carregamento, desembarque e o abate.

243 O medo, a dor e o estresse são fatores indesejáveis no momento do  
244 abate, além de acelerarem as reações bioquímicas e o processo de *rigor mortis*,  
245 infligem o bem-estar animal (LOWE et al., 1993; POLI et al., 2005). Pensando  
246 nisso, o Conselho de bem-estar dos Animais da Fazenda reconheceu a  
247 necessidade do bem-estar de peixes cultivados (FAWC, 1996) e pediu para que  
248 pesquisas fossem desenvolvidas, a fim de se obter métodos de abate  
249 humanitário. Segundo Maff (1995), para ser considerado humanitário, no abate,  
250 o animal deve ser induzido à insensibilidade imediatamente ou gradualmente,  
251 não passando por medo e/ou dor.

252 No entanto, o método de abate humanitário julgado como relativamente  
253 simples, torna-se um desafio quando aplicado às condições de aquicultura.  
254 Primeiro, a coleta de peixes é relatada apenas em grandes quantidades e,  
255 portanto, todos os números são altamente especulativos. Outro problema é o  
256 conhecimento limitado sobre como os peixes percebem e reagem à dor. Embora  
257 saiba-se que os peixes possuem nociceptores (SNEDDON et al., 2003), sua  
258 capacidade de manifestar as sensações de dor e sofrimento ainda é  
259 intensamente debatida, tornando problemático estimar a gravidade de um  
260 problema de bem-estar social (ROSE et al., 2014).

261

### 262 3.3.1 Avaliação de insensibilização

263 A definição de insensibilização pode ser relacionada a qualquer processo  
264 intencional que provoque a perda de consciência e sensibilidade sem dor,  
265 incluindo qualquer processo que provoque morte instantânea (EFSA, 2009).  
266 Podendo envolver métodos que tornem os peixes imediatamente inconscientes  
267 ou que cause uma perda de consciência mais lenta e progressiva durante um  
268 período, sem causar dor, angústia ou sofrimento. Além disso, é importante  
269 ressaltar que os métodos de atordoamento devem ser cientificamente validados,  
270 para que assim possam ser destinados como métodos de insensibilização  
271 (HUMANE SLAUGHTER ASSOCIATION, 2018).

272 Baseado em vários estudos que avaliaram a insensibilização em  
273 mamíferos, aves e humanos, Kestin et al. (2002) desenvolveram e validaram  
274 uma série de observações comportamentais para tentar avaliar o nível de função  
275 cerebral em peixes enquanto estão anestesiados/insensibilizados. Esse  
276 protocolo por sua vez, foi testado em diferentes espécies de peixes, onde se  
277 observa comportamentos fáceis de serem mensurados, produzidos e repetidos.  
278 O protocolo permite avaliar comportamento autoiniciado, que inclui natação e  
279 comportamento de endireitamento; respostas a estímulos, realizado com auxílio  
280 de uma agulha, qual é espetada no lábio e na cauda do peixe, e estimulação  
281 com 6 volts no lábio; reflexos clínicos, reflexo vestibulo-ocular e movimento  
282 opercular (respiração).

283 Segundo Pedrazzani et. al (2007), de 30 peixes insensibilizados por  
284 secção medular, 11 perderam a consciência e sensibilidade imediatamente após  
285 a aplicação do método, enquanto para o método de termonarçose, todos os  
286 animais permaneceram conscientes até a morte, segundo o protocolo de  
287 avaliação de Kestin et al. (2002). Resultados semelhantes foram encontrados  
288 para a perda de função cerebral em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), para  
289 o bagre africano (*Clarias gariepinus*) e para enguias (*Anguilla anguilla* L.)  
290 insensibilizadas e abatidas por choque térmico (EFSA, 2004).

291

### 292 3.3.2 Avaliação plasma sanguíneo

293 As vias neuroendócrinas do estresse em peixes são muito semelhantes  
294 às de outros vertebrados e possuem um sistema adrenérgico e um eixo  
295 hipotálamo-hipófise-inter-renal (HHI) (WENDELAAR-BONGA, 1997; WEBER,

296 2011). A ativação do eixo HHI, em resposta a um estímulo nocivo (estressor),  
297 leva à liberação de mediadores químicos (catecolaminas e corticosteroides) na  
298 corrente sanguínea (IWAMA et al. 1999; BARTON, 2002). As mudanças  
299 fisiológicas que caracterizam a resposta ao estresse permitem que os animais  
300 respondam de forma adaptativa ou compensatória, desencadeando uma série  
301 de mudanças fisiológicas. Essas respostas se dividem em respostas primárias,  
302 secundárias e terciárias (WENDELAAR-BONGA, 1997; IWAMA et al., 2004).

303 Na reação principal, a secreção de catecolaminas (epinefrina e  
304 norepinefrina) e cortisol no plasma aumenta. O resultado da reação primária  
305 pode levar a reações secundárias - alterações metabólicas que ajudam a  
306 produzir energia adicional, como alterações na glicose sanguínea, ácido láctico,  
307 glicogênio hepático e muscular. As reações que afetam o equilíbrio dos minerais,  
308 como alterações nos níveis de cloreto, sódio, potássio, proteína energética e  
309 osmolaridade plasmática, também são respostas secundárias ao estresse.  
310 Devido ao estresse de longo prazo e exaustão fisiológica, a resposta terciária  
311 pode ter consequências de longo prazo, afetando negativamente a função  
312 imunológica, exercícios, reprodução, taxa de crescimento, comportamento e  
313 sobrevivência (BARTON, 2002; WEBER, 2011).

314 Além do cortisol elevado, o estresse geralmente causa um aumento nos  
315 níveis plasmáticos de glicose e lactato (reações secundárias). As alterações  
316 nesses parâmetros metabólicos podem ser causadas pelos processos de  
317 glicogenólise e gliconeogênese mediados por catecolaminas e cortisol,  
318 respectivamente (PANKHURST, 2011). O aumento dos corticosteroides  
319 plasmáticos, além de regular o metabolismo dos carboidratos, também interfere  
320 no metabolismo das proteínas e na atividade da aminotransferase (MOMMSEN  
321 et al., 1999), indicando o papel funcional do cortisol no metabolismo  
322 intermediário.

323 O estresse agudo, causado no manejo que antecede o abate é relatado  
324 como causa de um rápido aumento do ácido láctico muscular e plasmático, bem  
325 como uma diminuição do pH sanguíneo e do conteúdo de oxigênio.  
326 Normalmente, essas alterações estão relacionadas à liberação de uma grande  
327 quantidade de catecolaminas nas células, seguida de ventilação, fluxo  
328 sanguíneo ramificado, trocas gasosas e rápido aumento dos níveis de glicose no  
329 sangue (BARTON; IWAMA, 1991; BROWN, 1993;).

330

## 331 3.3.3 Valor de R

332 Ao abater o animal, suas funções vitais não terminam no mesmo instante.  
333 De forma que uma série de modificações bioquímicas e estruturais ocorre  
334 simultaneamente, conduzindo a conversão do músculo em carne. Esta  
335 conversão, mais conhecida como *rigor mortis*, transforma o músculo que era  
336 flexível e elástico em um estado mais rígido e inextensível, isso ocorre devido à  
337 redução dos níveis de adenosina-5'-trifosfato (ATP) (RAMOS; GOMIDE, 2007).

338 O desenvolvimento do *rigor mortis* é altamente utilizado como indicador  
339 de estresse, relacionado ao processo de acidificação causado pela produção de  
340 ácido láctico no tecido muscular durante o pré-abate (NAKAYAMA et al., 1992;  
341 LOWE et al., 1993). O estresse *ante mortem* pode levar a uma situação de  
342 pânico, medo e fuga, fazendo com que os peixes utilizem suas reservas  
343 glicolíticas, conseqüentemente, diminuindo o tempo de *rigor mortis*, o que não é  
344 desejável (VIÉGAS et al., 2012).

345 Segundo Ramos e Gomide (2002), o valor de R é obtido através da divisão  
346 das absorbâncias de nucleotídeos de adenina e derivados de inosina, onde essa  
347 relação indica a queda do ATP (adenosina-5'-trifosfato) *post-mortem*. Desta  
348 forma, à medida que o *rigor* se desenvolve, o valor de R aumenta, de forma que,  
349 valores entre 1,05 e 1,10 correspondem ao início do *rigor mortis*, enquanto  
350 valores entre 1,30 e 1,35 indicam estabelecimento do *rigor*.

351 Acerete (2009), testando três métodos de abate (CO<sub>2</sub>, hipotermia e asfixia  
352 em gelo), verificou que o estabelecimento do *rigor* foi semelhante para os três  
353 grupos. No entanto, o início de *rigor* em alguns animais do grupo de asfixia em  
354 gelo começou antes que do grupo de CO<sub>2</sub>. Isso pode estar relacionado a  
355 movimentos bruscos e tentativas de fuga dos peixes, causando, portanto, maior  
356 consumo de ATP (BAGNI et al., 2007).

357

## 358 3.3.4 Defesas Antioxidantes

359 O estresse oxidativo ocorre devido à superprodução de espécies reativas  
360 de oxigênio (EROs), desta forma a produção de enzimas antioxidantes  
361 aumentam, devido a maior concentração de EROs (LOWE, 2000). Sendo  
362 extremamente reativa e não específica na natureza, as EROs geralmente  
363 oxidam biomoléculas tais como DNA, proteínas, lipídeos e hidratos de carbono,

364 e assim, prejudicam as funções celulares normais (BIHARI et al., 2016). Durante  
365 o processo de oxidação envolvido na geração de energia na cadeia de transporte  
366 de elétrons, as EROs podem ser formadas no meio intracelular. As três formas  
367 principais de EROs são: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais  
368 hidroxila, que são formados a partir da etapa de redução univalente do oxigênio  
369 molecular (BRAGA, 2012).

370 O sistema de defesa antioxidante contém enzimas e componentes não  
371 enzimáticos. O enzimático inclui uma cascata de enzimas chamadas enzimas  
372 antioxidantes. As enzimas antioxidantes são onipresentes e altamente  
373 conservadas em suas propriedades catalíticas, algumas delas existem em várias  
374 formas. O primeiro membro dessa cascata é a superóxido dismutase (SOD), que  
375 atua sobre o ânion  $O_2^-$ , formando peróxido de hidrogênio e  $O_2$ . O peróxido de  
376 hidrogênio é neutralizado por duas enzimas, catalase (CAT) e glutathione  
377 peroxidase (GPx) (BIHARI et al., 2016).

378 A catalase decompõe  $H_2O_2$  em oxigênio e água, enquanto a GPx reduz  
379  $H_2O_2$  e hidroperóxidos orgânicos acoplando-os com a oxidação da glutathione  
380 redutase (GSH). A glutathione redutase (GR) desempenha importante papel na  
381 conversão de glutathione oxidada a reduzida através da oxidação de NADPH.  
382 Posteriormente, NADP é gerado a partir de NADPH pela enzima desidrogenase  
383 da glicose-6-fosfato (G6PDH). A SOD, dependendo do seu grupo prostético,  
384 pode ser de três tipos; SOD-Fe (geralmente encontrada em bactérias), SODMn  
385 (exclusivamente mitocondrial), e SOD Cu-Zn (encontrada no citoplasma celular)  
386 (BIHARI et al., 2016).

387 A glutathione peroxidase tem várias isoenzimas, sendo sua principal função  
388 a eliminação do  $H_2O_2$  nas células, enquanto a catalase possui maior importância  
389 na proteção contra o estresse oxidativo grave (BIHARI et al., 2016). O sistema  
390 de defesa não enzimático, compreende pequenas moléculas orgânicas como,  
391 polifenóis, ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides e glutathione redutase que  
392 eliminam várias EROs (BIHARI et al., 2016).

393 O aumento do consumo de oxigênio provocado pelo estresse do peixe  
394 antes do abate, pode ocasionar maior exposição a ação de oxidantes causada  
395 pelo aumento na formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (LIMA;  
396 ABDALLA, 2001), ou seja, a sucessão de estímulos que perturbam a condição  
397 homeostática do animal antes do abate, pode gerar maior propensão ao estresse

398 oxidativo (FALOWO; FAYEMI; MUCHENJE, 2014) diminuindo a estabilidade  
399 oxidativa da carne, além de reduzir sua qualidade nutricional e tempo de vida útil  
400 (SECCI et al., 2016).

401

## REFERÊNCIAS

- 402  
403
- 404 ANIMAL BUSINESS. **Sociedade Nacional da Agricultura**. Disponível em:  
405 <<https://animalbusiness.com.br/producao-animal/criacao-animal/tilapia-o->  
406 [/segundo-peixe-mais-consumido-do-mundo/](https://animalbusiness.com.br/producao-animal/criacao-animal/tilapia-o-/segundo-peixe-mais-consumido-do-mundo/)>. Acesso em: 05 de set de 2020.
- 407 ACERETE, L.; REIG, L.; ALVAREZ, D.; FLOS, R.; TORT, L. Comparison of two  
408 stunning/ slaughtering methods on stress response and quality indicators of  
409 European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v.287, p.139-144, fev  
410 2009.
- 411 ASHLEY, P. J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal**  
412 **Behaviour Science**. Amsterdam, v. 104, p. 199-235, maio 2007.
- 413 BAGNI, M.; CIVITAREALE, C.; PRIORI, A.; BALLERINI, A.; FINOIA, M.;  
414 BRAMBILL, A.; MARINO, G. Pre-slaughter crowding stress and killing  
415 procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and  
416 sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 263, p.52-60, mar 2007.
- 417 BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.;  
418 FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.;  
419 CONRAD, J.; LACERDA, T.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (  
420 *Rhamdia quelen* Quoy ans Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic  
421 stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on  
422 immunosuppressive effects. **Aquaculture**. v. 237, p. 229-236, ago 2004.
- 423 BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular  
424 reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and**  
425 **Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, jul 2002.
- 426 BIHARI, G.; CHAINY, N.; PAITAL, B.; DANDAPAT, J. An Overview of Seasonal  
427 Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Defence Parameters in Some  
428 Invertebrate and Vertebrate Species. **Cientifica (Cairo)**. abr 2016:
- 429 BRAGA, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos para aplicação da**  
430 **metalômica na identificação de possíveis biomarcadores em plasma e**  
431 **fígado de ratos diabéticos**. 2012.
- 432 BRASIL. Portaria nº 3, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento Técnico de  
433 Manejo Pré-Abate e Abate Humanitário. **Diário Oficial da União**. Disponível  
434 em:< [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/bem-estar-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/bem-estar-animal/arquivos/arquivos-legislacao/in-03-de-2000.pdf)  
435 [animal/arquivos/arquivos-legislacao/in-03-de-2000.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/bem-estar-animal/arquivos/arquivos-legislacao/in-03-de-2000.pdf)>. Acesso em: 04, nov  
436 2020.
- 437 BRASIL. Portaria nº 62, de 10 de maio de 2018. Regulamento Técnico de  
438 Manejo Pré-Abate e Abate Humanitário. **Diário Oficial da União**. Disponível  
439 em:< [https://www.in.gov.br/materia/-](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/14922788/do1-2018-05-18-portaria-n-62-de-10-de-maio-de-2018-14922)  
440 [/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/14922788/do1-2018-05-18-portaria-](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/14922788/do1-2018-05-18-portaria-n-62-de-10-de-maio-de-2018-14922)  
441 [n-62-de-10-de-maio-de-2018-14922](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/14922788/do1-2018-05-18-portaria-n-62-de-10-de-maio-de-2018-14922)>. Acesso em: 04, nov 2020.

- 442 BROWN, J. A. Endocrine responses to environmental pollutants. **Fish**  
443 **Ecophysiology**. London: Chapman and Hall, v. 9, p. 276-296, 1993.
- 444 CAGGIANO, M. Quality in harvesting and post-harvesting procedures –  
445 influence on quality. Fish freshness and quality assessment for sea bass and  
446 sea bream. **File name megeformat**, 2002.
- 447 CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal**  
448 **Behaviour Science**, v. 86, p. 205-223, jun 2004.
- 449 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Species-specific welfare  
450 aspects of the main systems of the stunning and killing of farmed Atlantic  
451 salmon. p1–77. **EFSA Journal**, 2009.
- 452 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific report of the  
453 Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the  
454 Commission related to welfare aspects of animal stunning and killing methods.  
455 **EFSA Journal**, 2004.
- 456 EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. 2017. Disponível  
457 em:< [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21621836/producao-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21621836/producao-de-tilapia-no-brasil-cresce-223-em-dez-anos)  
458 [de-tilapia-no-brasil-cresce-223-em-dez-anos](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21621836/producao-de-tilapia-no-brasil-cresce-223-em-dez-anos)>. pg 15. Acesso em: 05 jul 2020.  
459
- 460 FALOWO, A. B.; FAYEMI, P. O.; MUCHENJE, V. Natural antioxidants against  
461 lipid-protein oxidative deterioration in meat products: A review. **Food Research**  
462 **International**. v.64, p. 171-181, out 2014.  
463
- 464 FAWC. **Farm Animal Welfare Council**. Report on the welfare of farmed fish.  
465 London.1996. Disponível em:<  
466 [https://www.gov.uk/government/publications/fawc-report-on-the-welfare-of-](https://www.gov.uk/government/publications/fawc-report-on-the-welfare-of-farmed-fish)  
467 [farmed-fish](https://www.gov.uk/government/publications/fawc-report-on-the-welfare-of-farmed-fish)>. Acesso em: 04 de nov de 2020.
- 468 FREIRE, C. E. C.; GONÇALVES, A. A. Diferentes métodos de abate do  
469 pescado produzido em aquicultura, qualidade da carne e bem-estar do animal.  
470 **HOLOS**. v.6, p.33-41, 2013.
- 471 HASTEIN, T.; SCARFE, A.D.; LUND, V.L. Science-based assessment of  
472 welfare: aquatic animals. **Revue Scientifique et Technique Office**  
473 **International des Epizooties**, v.24, n.2, p.529-547, jul 2005.
- 474 HUMANE SLAUGHTER ASSOCIATION (HSA). Humane slaughter of finfish  
475 farmed around the world. 70p. fev, 2018.
- 476 IWAMA, G.K.; VIJAYAN, M.M.; FORSYTH, R.B.; ACKERMAN, P.A. Heat shock  
477 proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, v. 39, p. 901-  
478 909, dez 1999.
- 479 IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; TODGHAM, A.E.; ACKERMAN, P.A.  
480 Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? **The Journal of**  
481 **Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, fev 2004.

- 482 JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU, A.H. Effect of anaesthesia with  
483 clove oil in fish (review). **Fish Physiol. Biochem.**v.38, p. 1545-1552, dez 2012.
- 484 KESTIN, S.C.; WOTTON, S.B.; ADAMS, A. The effect of CO<sub>2</sub>, concussion or  
485 electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare.  
486 **Quality in aquaculture, European Aquaculture Society**, Special Publication  
487 23, p. 380–381. 1995.
- 488 KESTIN S. C.; VAN DE VIS, J. W.; ROBB, D. H.F. Protocol for assessing brain  
489 function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them.  
490 **Veterinary Record**, v.150, p.302-307, mar 2002.
- 491 KNOWLES, T.G.; BROWN, S.N.; WARRISS, P.D.; LINES, J.; TINARWO, A.;  
492 SENDON, M. Effect of electrical stunning at slaughter on the quality of farmed  
493 turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1731-1738, nov 2008.
- 494 LAMBOOIJ, E.; VAN DER VIS, J.W.; KLOOSTERBOER, R.J.; PIETERSE, C.  
495 Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla Anguilla L.*):  
496 neurological and behavioural assessment. **Aquaculture**, v. 210, p.159-169, jul  
497 2002.
- 498 LAMBOOIJ, E.; KLOOSTERBOER, R.J.; GERRITZEN M.A.; VAN DE VIS, J.W.  
499 Assessment of electrical stunning in fresh water of African Catfish (*Clarias*  
500 *garipepinus*) and chilling in ice water for loss of consciousness and sensibility.  
501 **Aquaculture**, v. 254, p. 388–395, abr 2007.
- 502 LE, Q.; HU, J.; CAO, X.; KUANG, S.; ZHANG, M.; YU, N.; ZHENG, H.; WANG,  
503 Y.; LIU, H.; YANA, X. Transcriptomic and cortisol analysis reveals differences in  
504 stress alleviation by different methods of anesthesia in Crucian carp (*Carassius*  
505 *auratus*). *Fish Shellfish Immunol.* V. 84, p. 1170-1179, jan 2019.
- 506 LIMA, S.E.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação  
507 em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v.37,  
508 n.3, p. 293-303, jan 2001.
- 509 LINES, J.A.; ROBB, D.H.; KESTIN, S.C.; CROOK, S.C.; BENSON, T. Electric  
510 stunning: a humane slaughter method for trout. **Aquacult Eng**, v. 28, p. 141-  
511 154, ago 2003.
- 512 LOWE, D.T. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of pré-eclâmpsia.  
513 **Nitric Oxide** v.4, p.441-458, set 2000.
- 514 LOWE, T.; RYDER, J.M.; CARRAGER, J.F.; WELLS, R.M.G. Flesh quality in  
515 snapper, *Pagurus auratus*, affected by capture stress. **Journal of Food**  
516 **Science** v. 58, p. 770–773, jul 1993.
- 517 LYMBERG, P. In too deep: The welfare of intensively farmed fish. CIWF -  
518 **Compassion In World Farming: Hampshire**, 56 p., 2002.
- 519 MAFF. **The Welfare of Animals (Slaughter or Killing) Regulations**. Statutory  
520 Instruments number 731. London, HMSO. 1995. Disponível em:<  
521 <https://www.legislation.gov.uk/uksi/1995/731/made>>. Acesso em: 04 de nov de

- 522 2020.
- 523 MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress  
524 response in innovative species with particular focus on the use of the  
525 anaesthetics. **The Open Marine Biology Journal**. v. 5, p. 24-33, fev 2011.  
526
- 527 MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts:  
528 dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish**  
529 **Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, set 1999.
- 530 NAKAYAMA, T., LIU, D.-J., OOI, A. Tension change of stressed and unstressed  
531 carp muscles in isometric rigor contraction and resolution. **Nippon Suisan**  
532 **Gakkaishi**. v. 58, p.1517–1522, fev 1992
- 533 NORDGREEN, A. H.; SLINDE, E.; MOLLER, D., ROTH, B. Effect of Various  
534 Electric Field Strengths and Current Durations on Stunning and Spinal Injuries  
535 of Atlantic Herring. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.20, p. 110–115, jun  
536 2008.
- 537 OIE 2018. World organization for Animal Health. Welfare aspects of stunning  
538 and killing of farmed fish for human consumption. **Aquatic Animal Health**  
539 **Code** 1090, 1–4. Disponível em:< [https://www.oie.int/standard-setting/aquatic-](https://www.oie.int/standard-setting/aquatic-code/)  
540 [code/](https://www.oie.int/standard-setting/aquatic-code/)>. Acesso em: 04 nov de 2020.
- 541 OLIVEIRA FILHO, P.R.C.; OLIVEIRA, C.A.F.; SOBRAL, P.J.A.; BALIEIRO,  
542 J.C.C.; NATORI, M.M.; VIEGAS, E.M.M. How stunning methods affect the  
543 quality of Nile tilapia meat. **Journal of Food**. V.14, p. 37-41, mar 2014.
- 544 PANKHURST, N.W. The endocrinology of stress in fish: an environmental  
545 perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, p. 265-275,  
546 jan 2011.
- 547 PEDRAZZANI, A. S.; MOLENTO, C. F. M.; CARNEIRO, P. C. F.; CASTILHO,  
548 M. F. Senciência e bem-estar de peixes: uma visão de futuro do mercado  
549 consumidor. **Panorama da aquicultura**. p. 24-29 ago 2007.
- 550 PEIXE BR. ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA. **Associação Brasileira**  
551 **da Piscicultura**. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br>>. Acesso em: 05  
552 de set de 2020.
- 553
- 554 POLI, B. M.; PARISI, G.; SCAPPINI, F.; ZAMPACAVALLLO, G. Fish welfare and  
555 quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. **Aquaculture**  
556 **Internacional**. v.13, p. 29-49, jan 2005.
- 557 RAMOS, E. M.; GOMIDE, L.A.M.; Avaliação da Qualidade de Carnes.  
558 Fundamentos e Metodologias. Voçosa. Minas Gerais. p. 39-370, 2007.
- 559 RIBAS, L., FLOS, R., REIG, L., MACKENZIE, S., BARTON, B. A., TORT, L.  
560 Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*)  
561 before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**,

- 562 Amsterdam, v. 269, p. 250-258, set 2007.
- 563 ROBB, D.H.F.; KESTIN, S.C. Methods Used to Kill Fish: Field Observations and  
564 Literature Reviewed. **Animal Welfare**. V. 11, p. 269-282, nov 2002.
- 565 ROBB, D.H.F.; KESTIN, S.C.; WARRISS, P.D. Muscle activity at slaughter: I.  
566 Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. **Aquaculture**, v.182, p.  
567 261– 269, jan 2000.
- 568 ROSE, J.D.; ARLINGHAUS, R.; COOKE, S.J.; DIGGLES, B.K.; SAWYNOK, W.;  
569 STEVENS, E.D.; WYNNE, C.D.L. Can fish really feel pain? **Fish and Fisheries**.  
570 v. 13, p. 1–37, out 2014.
- 571 ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic**  
572 **animals**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 240 p., mai 2008.
- 573 SECCI, G.; PARISI, G.; DASILVA, G.; MEDINA, I. Stress during slaughter  
574 increases lipid metabolites and decreases oxidative stability of farmed rainbow  
575 trout (*Oncorhynchus mykiss*) during frozen storage. **Food Chemistry**. v. 190, p.  
576 5-11, mai 2016.
- 577 SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma  
578 cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil  
579 anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p.  
580 177-185, mar 2003.
- 581 SNEDDON, L.U.; BRAITHWAITE, V.A.; GENTLE, M.J. Do fishes have  
582 nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system.  
583 Proceedings of the Royal. **Society Biological Sciences Series**. v. 270, p.  
584 1115–1121, jun 2003.
- 585 VAN DE VIS, H.; KESTIN, S.; ROBB, D.; OEHLENSCHLAGER, J.; LAMBOOIJ,  
586 B.; MUNKNER, W.; KUHLMANN, H.; KLOOSTERBOER, K.; TEJADA, M.;  
587 HUIDOBRO, A.; OTTERA, H.; ROTH, B.; SORENSEN, N. K.; AKSE, L.;  
588 BYRNE, H.; NESVADBA, P. 2003. Is humane slaughter of fish possible for  
589 industry? **Aquaculture Research**. v. 34, p. 211–220, jan 2003.
- 590 VIEGAS, E.M.M.; PIMENTA, F.A.; PREVIERO, T.C.; GONÇALVES, L.U.;  
591 DURÃES, J.P.; RIBEIRO, M.A.R.; OLIVEIRA FILHO, P.R.C. Métodos de abate  
592 e qualidade da carne de peixe, Pirassununga, SP. **Zootec**. v.61, p. 41-50, abr  
593 2012.
- 594 WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological**  
595 **Reviews**, v. 77, p. 591-625, jul 1997.
- 596 WEBER, E.S. Fish analgesia: pain, stress, fear, aversion, or nociception?  
597 **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 14, p. 21-  
598 32, jan 2011.
- 599 WOLFFFROM, T.; SANTOS, M.L. Farmed Fish and Welfare. European  
600 commission. Directorate-general for fisheries – **Research and Scientific**  
601 **Analysis Unit**, 39p., 2014.

602 ZAHL, I.H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish:  
603 implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 201-  
604 218, fev 2012.

605

606 **4 ARTIGO: EFFICACY OF DIFFERENT METHODS WITH OR WITHOUT**  
607 **PRIOR EUGENOL TREATMENT IN STUNNING NILE TILAPIA**

608

609 **\*Artigo científico escrito seguindo as normas da revista Applied Animal Behaviour Science**

610

611 Daniela Kaizer Terto<sup>1\*</sup>, Amanda Gobeti Barro<sup>1</sup>, Evelyn Rangel dos Santos<sup>1</sup>, Guilherme  
612 Agostinis Ferreira<sup>1</sup>, Jéssica Gonçalves Vero<sup>1</sup>, Fernanda Maria Rutka Dezopi<sup>5</sup>, Vanessa Bezerra<sup>4</sup>,  
613 Juliana Delatim Simonato Rocha<sup>2</sup>, Rafael Humberto de Carvalho<sup>3</sup>, Ana Maria Bridi<sup>3</sup>

614

615 <sup>1</sup> Ph.D. student in Animal Science, Veterinary Medicine Department, Londrina State University,  
616 Highway Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380, Londrina - Paraná, Brazil;

617 <sup>2</sup> Ph.D. Professor, Department of Physiological Sciences, Londrina State University;

618 <sup>3</sup> Ph.D. Professor, Zootechny Department, Londrina State University;

619 <sup>4</sup> Ph.D. student in Biological Sciences, Department of Physiological Sciences, Londrina State  
620 University;

621 <sup>5</sup> MSc. student in Animal Science, Veterinary Medicine Department, Londrina State University

622

623 E-mail: [amandagbarro@gmail.com](mailto:amandagbarro@gmail.com); [evelyn.srangel@uel.br](mailto:evelyn.srangel@uel.br); [guiagostinis@hotmail.com](mailto:guiagostinis@hotmail.com) ;  
624 [jgveroo@gmail.com](mailto:jgveroo@gmail.com) ; [fernandadezopi@gmail.com](mailto:fernandadezopi@gmail.com) ; [jimonato@uel.br](mailto:jimonato@uel.br); [rafael.carvalho@uel.br](mailto:rafael.carvalho@uel.br);  
625 [vanessa.bzrr@gmail.com](mailto:vanessa.bzrr@gmail.com); [ambridi@uel.br](mailto:ambridi@uel.br)

626 \*Corresponding author: +55 43 996251735. E-mail address: [dkaizerterto@gmail.com](mailto:dkaizerterto@gmail.com)

627

628 Abstract

629 As sentient beings, it is advisable to stun the fish prior to slaughter. Incidentally, with the  
630 increasing productivity of tilapia, there is an increasing necessity to establish stunning methods  
631 that will prioritize the welfare of these fish. There are still no laws that address this issue, and  
632 the recommendations, including the one made by the World Organization for Animal Health, do

633 not specifically mention the best stunning method for this species. The objective of our study  
634 was to evaluate the efficacy of stunning methods, namely electronarcosis, medullary section,  
635 and thermonarcosis, with or without anesthetization with eugenol, with respect to animal  
636 welfare. We used 150 tilapia (*Oreochromis niloticus*) of premium strains divided into six  
637 treatment groups, with 25 animals in each group. The experimental design was completely  
638 randomized in a  $3 \times 2$  factorial scheme (three stunning methods, with or without the use of  
639 eugenol). To verify the efficacy of the methods, we evaluated behavioral responses, such as  
640 swimming, balance, response to stimulus, and vestibulo-ocular reflex. Thereafter, we collected  
641 blood for glucose and lactate analyses. The animals were slaughtered by sectioning the gill  
642 arches, followed by filleting for determining the R-values (extent of rigor mortis), glutathione  
643 reductase activity, and catalase activity. Incidentally, the group of animals that were  
644 anesthetized with eugenol prior to stunning recorded a higher number of stunned animals than  
645 in the group that was not treated with the compound. Based on the behavioral analyses, the  
646 group subjected to electronarcosis recorded the highest number of non-insensitized animals, the  
647 highest lactate value in the eugenol-treated group, faster onset of rigor mortis, higher  
648 glutathione concentration, and higher catalase activity, as compared to the corresponding values  
649 in the other groups. The group stunned by medullary section presented high lactate levels for the  
650 animals that were not treated with eugenol, and the group stunned by thermonarcosis presented  
651 high glucose values, irrespective of the use of eugenol. The use of the anesthetic eugenol was  
652 effective in evaluating the behavioral parameters of tilapia. However, similar to previous studies  
653 regarding the efficacy of stunning methods in reducing the stress caused to these animals, we  
654 did not observe the complete absence of stress in any of the methods. Electronarcosis was the  
655 method that achieved the highest level of stress. On the contrary, medullary section and  
656 thermonarcosis achieved acceptable results with respect to some aspects of animal welfare  
657 analyses.

658

659 Keywords: Animal welfare; Electronarcosis; Glutathione; Lactate; Medullary section;

660 Thermonarcosis.

661

## 662 1. Introduction

663 Aquaculture has exhibited a steady and constant growth; however, there has been a  
664 simultaneous rise in the concern for consumer health, ethical issues, animal welfare, and product  
665 quality. Incidentally, aquatic animal welfare is a relatively new concept with limited knowledge  
666 regarding the factors specific to aquatic animals (Hastein et al. 2005).

667 Welfare concepts are usually based on the feelings of animals. Hence, they have been  
668 applied to animals that are considered capable of feeling fear, pain, and suffering, thereby  
669 including species that have higher cognitive levels, as compared to those of fish (Ashley 2007).  
670 Moreover, fish do not emit any sound when they are afraid or stressed, which, in turn leads to an  
671 indifference on part of the humans (Maria Poli 2009). However, many studies have  
672 demonstrated that fish are sentient beings (Sneddon 2009), that is, they are aware of subjective  
673 sensations and feelings (Hastein et al. 2005). Chandroo et al. (2004) evaluated the behavioral  
674 anatomy and physiology of fish and suggested that they are capable of cognition and can  
675 experience as well as differentiate between positive and negative feelings (hunger, pain,  
676 comfort, discomfort, pleasant, and unpleasant).

677 Scientific studies researching the anatomy, physiology, and behavior of fish in response  
678 to analgesics suggest that they possess characteristics of conscious or motivational cognition of  
679 affective states, and there may be convincing evidence that fish can feel fear, pain, and suffering  
680 (Cotte 2012). In fact, natural anesthetics are used in fish farming to avoid stress to the animals  
681 during handling, to prevent physical injury, and to reduce metabolism (Coyle et al. 2004).

682 Eugenol is one of the most widely used anesthetics in fish stunning because of its low  
683 toxicity and mortality risks for the animal (Roubach et al. 2005). When applied in an adequate  
684 concentration, it is absorbed by the gills. Thereafter, it quickly enters the bloodstream, reaches  
685 the cortex of the brain, and inhibits it; ultimately, it acts on the basal ganglia, cerebellum, and  
686 medulla to cause the anesthetic effect (Coyle et al. 2004). Hence, it can be suitably applied to  
687 the fish just before their slaughter.

688 Fish slaughter is usually performed in two stages, namely stunning, i.e., making the fish

689 insensible to pain, and killing, and these two steps can be performed at one go or separately.  
690 However, if there is a gap between stunning and killing, then the stunning should be sufficient  
691 to prevent the recovery of consciousness until the animal is killed (Lines et al. 2003).

692 This study aimed to evaluate the effects of stunning by electronarcosis, medullary  
693 section, and thermonarcosis with or without the use of a natural anesthetic, eugenol, with  
694 respect to the animal welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

695

## 696 2. Material and methods

### 697 2.1. Ethical statement

698 The experimental study design was approved by the Ethics Committee of the State  
699 University of Londrina, under process number 9085.2018.32.

700

### 701 2.2. Place of study

702 The study animals were obtained from an excavated tank at Fazenda São José, located  
703 in the municipality of Ibiporã-PR, Brazil (latitude: 23°15'44.30 "S, longitude: 50°59'54.84 "W),  
704 and transported to the Frigorífico Pelisson Comércio de Peixes Eireli-ME, located in the same  
705 property (140 m away). After arrival, they remained in the purification tank for 1 h to  
706 reestablish their homeostasis, which might have been affected by the stress of loading, transport,  
707 and unloading. This tank presented with an average water temperature of 28.8 °C, pH = 7, and  
708 dissolved oxygen of 25.5 mg L<sup>-1</sup>.

709

### 710 2.3. Experimental design

711 We used 150 tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish of premium strain, with an average  
712 weight of 900 ± 100 g and an average length of 35 ± 5 cm, for this study. The fish were divided  
713 into three groups, according to stunning methods, namely electronarcosis, medullary section,  
714 and thermonarcosis. Each group included 50 tilapia, of which 25 were eugenol-treated and 25  
715 without eugenol treatment prior to stunning. Each stunning method was performed on a  
716 different day. The fish were fasted for 12 h until slaughter. The experimental design was

717 completely randomized in a  $3 \times 2$  factorial scheme (three stunning methods, with or without the  
718 utilization of eugenol).

719

#### 720 *2.4. Eugenol treatment*

721 In a box containing 30 L of water,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of eugenol diluted in 0.01% ethanol PA  
722 was added, and each fish was kept in it for 3 min (Delbon and Paiva 2012). For each stunning  
723 treatment, 25 tilapia were submitted to the eugenol-induced anesthetic process prior to the  
724 stunning procedure. The aim was to investigate the efficacy of using eugenol in combination  
725 with the stunning methods.

726

#### 727 *2.5. Stunning methods*

##### 728 *2.5.1. Electronarcosis*

729 The fish were transferred from the external depuration tank by belts to a tank containing  
730 water (ionized with 0.03% salt), where they received a pre-stunning treatment of 40 V for 10 s.  
731 Thereafter, they were relocated to another belt and taken to a compartment, where they were  
732 hoisted with two hooks inserted in the operculum from the lower part of the compartment.  
733 Subsequently, the fish were passed into a second tank, containing water ionized with 0.03% salt,  
734 where they individually received a shock of 70 V for 10 s and were stunned.

735

##### 736 *2.5.2. Medullary section*

737 This process was performed on individual fish by a properly trained collaborator, with  
738 the help of a sharp knife introduced through one of the operculum and reaching the animal's  
739 marrow, according to a previously described protocol (Pedrazzani et al. 2007).

740

##### 741 *2.5.3. Thermonarcosis*

742 The animals were placed in a box containing 15 L of water and 15 kg of ice,  
743 maintaining a temperature of  $1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , for 15 min, as described by Robb and Kestin (2000).

744

745 *2.6. Evaluation of the effects of the stunning methods*

746           Immediately after stunning, each fish was transferred to a plastic box containing 30 L of  
747 water, which was sufficient to cover them. Subsequently, their behavioral parameters were  
748 evaluated, according to the “Protocol for brain evaluation in fish and the effectiveness of  
749 methods used for stunning and killing” by Kestin et al. (2002) with minor modifications. The  
750 observed variables were divided into the following three categories: (1) self-initiated behavior  
751 (swimming and balance), (2) response to stimulus (needle-prick in the tail), and (3) clinical  
752 reflex (vestibulo-ocular reflex).

753           The first three variables, i.e., swimming, balancing, and response to needle-prick, were  
754 tested in water. For testing the swimming ability, the fish were placed in water in the normal  
755 position to check if they could swim normally. To determine the balance, the fish were  
756 positioned inverse to their normal positions to verify their ability to return to the normal  
757 position. Finally, they were subjected to a pin-prick on the tail to induce escape behavior.  
758 Thereafter, the fish were taken out of water and subjected to rotational movements to verify the  
759 functioning of their vestibulo-ocular reflexes. For each attribute, a score was stipulated, where 1  
760 = insensitized and 2 = not insensitized (Figure 1).

761

762 *2.7. Evaluation of blood plasma*

763           Immediately after evaluation of the effects of stunning, the fish were removed from  
764 water, one by one, and propped up on a bench for blood collection. We inserted a 0,8 × 30 mm  
765 needle, attached to a 5 mL syringe, into the left lateral line of the fish near the caudal fin since it  
766 is highly irrigated with blood vessels, which facilitates the process of blood collection. After  
767 collection, the blood was transferred to 4 mL FisrtLab® vacuum tubes containing fluoride and  
768 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), indicated for glucose and lactate assessment.

769           The blood samples were centrifuged in a Centurion Scientific K3 Series centrifuge at  
770 3,000 rpm for 10 min at 18 °C. Thereafter, only the plasma was collected and transferred to 2  
771 mL eppendorf tubes, frozen to -20 °C, and stored until it had to be thawed for glucose and  
772 lactate analyses. All these experiments were performed in the laboratory located in the

773 veterinary hospital of the State University of Londrina.

774 Plasma samples were evaluated by the Siemens/Dimension Gluc Ver Flex and  
775 Dimension Lactic Acid method for glucose and lactate, respectively. All these analyses were  
776 performed by the Siemens Dimension Xpand Plus device (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.,  
777 USA).

778

#### 779 2.8. *Extension of rigor mortis (R-value)*

780 A 10 cm long muscle sample was resected from the caudal portion of the filet on the  
781 right side, packed in an aluminum foil, stored in liquid nitrogen, and taken to the laboratory for  
782 R-value analysis. The analysis was performed according to the methodology described by  
783 Honikel and Fischer (1977).

784

#### 785 2.9. *Antioxidant defenses*

786 For the antioxidant defense analyses, tissue samples were resected from the dorsal  
787 region, more towards the center of the right filet, of each animal. These samples were placed in  
788 2 mL eppendorf tubes and stored in a -80 °C freezer for further analysis. The analyses were  
789 performed in the Laboratory of Animal Ecophysiology (LEFA) at the State University of  
790 Londrina.

791

##### 792 2.9.1. Protein

793 Antioxidant defenses were measured per mg of protein, where the protein analysis was  
794 performed according to the Bradford (1976) protocol.

795

##### 796 2.9.2. Catalase (CAT) activity

797 Catalase (CAT) activity was determined by the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition in the  
798 resected tissue samples. The decrease in the absorbance was determined at 240 nm, according to  
799 a previously described protocol (Beutler 1975). The CAT activity was expressed as  $\mu\text{mol}$  of  
800 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg of protein<sup>-1</sup>.

801

## 802 2.9.3. Glutathione (GSH) reductase activity

803 The amount of GSH in the tissue samples was determined according to the method  
804 described by Beutler et al. (1963) in which the reaction between GSH and its substrate 5,5'-  
805 dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to form thiolate (TNB) is quantified at 412 nm and  
806 expressed as  $\mu\text{g}$  of GSH  $\text{mg}$  of protein<sup>-1</sup>.

807

808

809 2.10. *Statistical Analysis*

## 810 2.10.1. Stunning test

811 Fisher's analysis was performed to compare the results among the groups using R 4.0.2  
812 software, and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

813

## 814 2.10.2. Factorial

815 The data were checked for normality of errors and homogeneity of variances using the  
816 Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ) and Bartlett ( $p < 0.05$ ) tests, respectively. Subsequently, these were  
817 submitted to variance analysis, and the means were compared using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The  
818 statistical analyses were processed using R 4.0.2 software with the ExpDes package (R Core  
819 Team 2020).

820

## 821 3. Results

822 We observed a higher number of stunned tilapia among the eugenol-treated groups, as  
823 compared to that in the groups of fish that were not anesthetized with eugenol before the  
824 stunning procedure. The results are demonstrated with respect to the four behavioral variables  
825 (swimming, balance, response to stimulus, and vestibulo-ocular reflex) within each stunning  
826 method (electronarcosis, medullary section, and thermonarcosis) (Table 1).

827 Incidentally, medullary section and thermonarcosis resulted in the highest number of  
828 stunned tilapia, with and without anesthetic utilization. However, in the group of tilapia that

829 underwent thermonarcosis without the use of eugenol, only 80% remain stunned when subjected  
830 to the needle-prick test; this efficiency is lower as compared to that of the other groups.

831 Moreover, for the group of tilapia that underwent stunning by medullary section without the use  
832 of eugenol, only 48% remain insensitized when tested for the vestibulo-ocular reflex (Table 1).

833 Incidentally, the electronarcotic treatment is not effective in stunning the tilapia that  
834 were not treated with eugenol prior to the stunning procedure. As demonstrated by the results in  
835 all four observed parameters, 88%, 92%, 100%, and 92% of these animals did not show  
836 stunning behavior when subjected to the swimming test, balance test, needle-prick stimulus, and  
837 vestibulo-ocular reflex test, respectively (Table 1).

838 The plasma glucose levels are higher in the eugenol-treated tilapia, as compared to that  
839 in the tilapia that were not anesthetized with eugenol, in case of the electronarcotic and  
840 medullary section stunning treatments; however, there is no difference in the plasma glucose  
841 levels for the tilapia subjected to thermonarcosis, with or without the use of eugenol (Table 2).  
842 Moreover, for the tilapia that were not anesthetized with eugenol, thermonarcosis led to the  
843 highest plasma glucose value (Table 2).

844 Among the eugenol-treated tilapia, the plasma lactate levels are highest in case of  
845 electronarcotic stunning, while among tilapia that were not anesthetized by eugenol, plasma  
846 lactate levels are highest in case of medullary section stunning (Table 2). Interestingly, lowest  
847 lactate levels are observed in the tilapia stunned by thermonarcosis, and the values do not differ  
848 between the fish that were or were not treated with eugenol (Table 2).

849 The R-value is the highest for the eugenol-treated fish stunned by electronarcosis, and it  
850 differs from that of the fish subjected to electronarcosis without eugenol treatment (Table 2).

851 There is no difference in the R-values between the fish stunned by medullary section and  
852 thermonarcosis with respect to the use of eugenol as well as the stunning method (Table 2).

853 The GSH concentration is the highest in the tilapia stunned by electronarcosis without  
854 being anesthetized by eugenol, followed by that in the tilapia stunned by electronarcosis after  
855 being treated with eugenol (Table 2). Incidentally, the fish subjected to stunning by  
856 thermonarcosis and medullary section did not show any difference in GSH concentration with

857 respect to the use of eugenol (Table 2).

858 With respect to CAT activity, there is no interaction between stunning methods and the  
859 use of eugenol as an anesthetic. The tilapia subjected to electronarcosis exhibit the highest  
860 catalase values, followed by the ones subjected to thermonarcosis and medullary section (Table  
861 3). There is no difference between the groups, with or without the application of eugenol.

862

#### 863 4. Discussion

864 In this study, we determined the efficiency of three different stunning methods  
865 with/without the use of the anesthetic eugenol with respect to animal welfare during the  
866 slaughtering process of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). According to Becker et al. (2012),  
867 the use of anesthetics and/or sedatives in water helps to reduce the stress occurring due to any  
868 stimulus. This statement corroborates the results observed in the present study with respect to  
869 the different stunning methods. In all three stunning procedures, there was a higher percentage  
870 of stunned animals among the eugenol-treated group than in the group that did not use the  
871 anesthetic prior to stunning.

872 Anesthesia is usually performed by immersing the fish in a bath containing a suitable  
873 concentration of an anesthetic that gets absorbed through the gills and rapidly enters the  
874 bloodstream. The drug initially inhibits the brain cortex, causing tactile loss in the animal,  
875 followed by excitation of the basal ganglia and cerebellum, and finally reaches the spinal cord,  
876 where anesthesia sets in (Coyle et al. 2004).

877 Incidentally, plasma glucose and lactate levels are good indicators of stress because the  
878 changes in their concentrations are easily detectable (Simões and Gomes 2009). This study  
879 demonstrates that subjecting the fish to stunning methods, with/without the use of eugenol,  
880 causes stress to the animals. The glucose levels of the fish were above the normal range for  
881 tilapia, i.e.,  $70.0 \pm 25.7 \text{ mg dL}^{-1}$  (Moreira et al. 2015), irrespective of the stunning method or the  
882 use of eugenol. With respect to lactate, only the fish subjected to thermonarcosis, both with and  
883 without eugenol treatment, exhibited lactate levels within the normal parameters of tilapia,  $1.3 \pm$   
884  $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$  (Moreira et al. 2015). On the contrary, electronarcosis and medullary section, with

885 or without prior anesthetic treatment, led to above-average values for plasma lactate in the fish.

886           The application of a stressor results in the body's prompt preparation to overcome the  
887 imposed challenge. The primary responses include perception of a change and initiation of  
888 neuroendocrine responses, such as the rapid release of catecholamines and cortisol into the  
889 bloodstream. In response to the secretion of these hormones, a set of physiological, biochemical,  
890 and secondary structural reactions occurs as an attempt to increase the resistance and improve  
891 the adaptation, according to the degree of severity or persistence of the stressor (Barton 2002).  
892 An instance of such secondary response includes hyperglycemia, hepatic and muscular  
893 hyperglycemia, and lactic acid accumulation, wherein the body requests extra energy to adapt to  
894 an adverse condition (Barton 2002).

895           In the present study, we observed that the animals that were exposed to the stressor for a  
896 longer time exhibited higher plasma glucose level than the ones that had a short-time exposure.  
897 Result found in thermonarcosis stunning, which was based on 15 minutes of exposure.  
898 Additionally, some of the animals were exposed to the anesthetic eugenol for 3 min prior to  
899 stunning, thereby causing a greater exposure to the stressors.

900           Changes in the anaerobic metabolism caused by insufficient ventilation and impaired  
901 gas exchange during periods of unconsciousness may lead to increased plasma lactate levels.  
902 Moreover, muscle contractions that occur during the electronarcotic shocks exacerbate the  
903 effects of reduced/no ventilation, thereby leading to increased lactic acid secretion (Trushenski  
904 et al. 2012). This may be the probable reason for the highest plasma lactate levels in the  
905 eugenol-treated fish subjected to electronarcosis.

906           Stunning by medullary section also led to high lactate levels in the fish. This may be  
907 attributed to the animal's exposure to air, which exacerbates the stress in the pre-slaughter  
908 period and contributes significantly at least to a part of this result.

909           The R-value is characterized as a measure of the extent of rigor mortis, which appears  
910 as a consequence of the first post-mortem biochemical changes. It can be influenced by extrinsic  
911 factors, such as mode of capture, stocking temperature, and mainly the way in which the fish is  
912 stunned and subsequently slaughtered (Almeida et al. 2005). High R-values signify the early

913 establishment of rigor mortis, and this was noted in the animals stunned by electronarcosis in  
914 this study, thereby corroborating the idea of greater stress caused by this method, as compared  
915 to that in the other stunning methods. Since the stress caused in the pre-slaughter period leads to  
916 the utilization of glycolytic reserves by the fish, thereby leaving the pH of the meat closer to  
917 neutrality, accelerating the action of muscle enzymes (autohydrolysis), or development of  
918 bacteria, there is less time for the establishment of rigor (Viégas et al. 2012). The R-values for  
919 the fish subjected to electronarcosis, with and without eugenol treatment, are close to 1.30 –  
920 1.35, which has been stipulated by Ramos and Gomide (2007) as a reference range for  
921 establishing rigor mortis.

922         In the present study, we observed that the highest number of animals responding to  
923 behavioral stimuli was in case of the fish stunned by electronarcosis, i.e., in comparison to the  
924 fish stunned by medullary section and thermonarcosis, this group consisted of a higher number  
925 of non-insensitized tilapia. Moreover, they exhibited a faster onset of rigor mortis, a higher  
926 concentration of GSH, and a higher degree of catalase activity than that in the other fish groups.  
927 The results of our analyses indicate that the fish subjected to electronarcosis experienced intense  
928 stress conditions, wherein the electrical stimulation resulted in a fight-or-flight reaction that  
929 intensified muscle activity (Erikson et al. 2016).

930         According to Winston and Di Giulio (1991), the tripeptide GSH and the CAT enzyme  
931 are biomarkers of oxidative stress. Glutathione reductase is responsible for maintaining the  
932 glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) ratio under stress conditions, and catalase is the  
933 main antioxidant enzyme that constitutes the first line of defense against reactive oxygen  
934 species (ROS) by converting  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$  (Pandey et al. 2003, Nikinmaa 2014).  
935 Incidentally, GSH is one of the most important, intracellular, biological thiols because of its  
936 ability of scavenging free radicals inside the cells. It functions directly as well as indirectly in  
937 neutralizing ROS, thereby serving as the first line of antioxidant defense. Moreover, it  
938 participates in conjugation with the enzymes of the oxidative stress pathway. In fact, it is  
939 conjugated to other metabolites, in biotransformation reactions, via enzymes, such as  
940 glutathione S-transferase (GST) (Lushchak 2016). The GSH has sulfhydryl (-SH) groups that

941 are oxidized at disulfide bridges to form GSSG, which, in turn, is reduced by the action of the  
942 enzyme glutathione reductase, to form GSH again. According to Halliwell and Gutteridge  
943 (2007), the higher the activity of CAT, the worse is the cellular redox state, thereby indicating a  
944 highly stressed condition of the fish, which leads to the greater need for this enzyme to acts  
945 against the stressors. In this study, the fish subjected to electronarcosis exhibited the highest  
946 levels for these two indicators of oxidative stress. The explanation for these high GSH levels  
947 may be the same as that for CAT.

948           Interestingly, Vargas Baldi et al. (2018) had demonstrated that the electronarcotic  
949 stunning method caused unconsciousness in the marine fish, *Rachycentron canadum*, in a  
950 shorter period, as compared to the time taken in case of thermonarcosis and CO<sub>2</sub> narcosis.  
951 Therefore, the authors considered electronarcosis to be the most effective method with respect  
952 to the welfare of this animal.

953           These results demonstrate the importance of conducting animal stunning and welfare  
954 studies with different fish species since the different characteristics, for example anatomical  
955 variations, can provide different resistances to the same stunning method (Llonch et al. 2012).  
956 Furthermore, apart from physiological parameters, the electrical parameters associated with the  
957 equipment, such as amperage, voltage, and type of current (alternating or direct), along with the  
958 animal's exposure time, can also influence the efficacy of stunning these animals.

959           From an animal welfare point of view, thermonarcosis appears to be an inappropriate  
960 stunning method because the poikilothermic fish tend to maintain their thermo-regulatory  
961 processes, thereby leading to exhaustion and suffering before stunning (Hastein et al. 2005).  
962 However, by reducing muscle temperature, it is possible to decrease the rate of the initial meat  
963 degradation process as well as the autolytic reactions that begin after slaughter, thereby delaying  
964 the onset and resolution of rigor mortis and postponing the meat spoilage process (Skjervold et  
965 al. 2001).

966           Brijs et al. (2021) demonstrated that application of a single stunning method was not  
967 able to completely prevent anxiety, pain, and suffering in the African catfish (*Clarias*  
968 *gariiepinus*). Hence, these authors suggest the sequential combination of different stunning

969 methods as a promising alternative to improve the animal welfare conditions.

970

## 971 5. Conclusion

972           The use of the anesthetic eugenol was effective in evaluating the behavioral parameters  
973 of tilapia that indicate complete stunning. However, the stress parameters of these animals  
974 showed similar results to that observed in previous studies related to stunning methods, i.e.,  
975 none of the methods was able to ensure complete stress avoidance during stunning. In  
976 conclusion, electronarcosis was the method that obtained the highest stress level. The medullary  
977 section and thermonarcosis demonstrated acceptable results with respect to some parameters of  
978 animal welfare analyses.

979

## 980 Declaration of interest

981           The authors declare that they have no competing interests.

982

## 983 Acknowledgments

984           We would like to thank the National Council for Scientific and Technological  
985 Development (CNPq), for granting the scholarship.

986

## 987 References

988 Almeida, N.M, Batista, G.M., Kodaira, M., Val, L.A., Lessi, E. 2005. Determinação do índice  
989 de rigor-mortis e sua relação com a degradação dos nucleotídeos em tambaqui (*Colossoma*  
990 *macropomum*), de piscicultura e conservados em gelo. *Ciência Rural*, 35, 698-704. doi:  
991 [10.1590/S0103-84782005000300034](https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300034).

992

993 Ashley, P.J. 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour*  
994 *Science*, 104, 199-235. doi: [10.1016/j.applanim.2006.09.001](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001).

995

996 Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes

- 997 in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 517-525. doi:  
998 [10.1093/icb/42.3.517](https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517).  
999
- 1000 Becker, A.G., Parodi, T.V., Heldwein, C.G., Zeppenfeld, C.C., Heinzmann, B.M., Baldisserotto,  
1001 B. 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the  
1002 essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 789-796. doi:  
1003 [10.1007/s10695-011-9562-4](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9562-4).  
1004
- 1005 Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood  
1006 glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888. PMID: [13967893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13967893/).  
1007
- 1008 Beutler, E. 1975. The preparation of red cells for assay In: *Red Cell Metabolism: A Manual of*  
1009 *Biochemical Methods* (ed. Beutler E), Grune & Straton. New York 8-18.  
1010
- 1011 Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities  
1012 of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-  
1013 254. doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).  
1014
- 1015 Brijs, J., Sundell, E., Hjelmstedt, P., Berg, C., Senčić, I., Sandblom, E., Axelsson, M., Lines, J.,  
1016 Bouwsema, J., Ellis, M., Saxer, A., Gräns, A. 2021. Humane slaughter of African  
1017 sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus*): effects of various stunning methods on brain  
1018 function. *Aquaculture*, 531. doi: [10.1016/j.aquaculture.2020.735887](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735887), [735887](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735887).  
1019
- 1020 Chandroo, K.P., Duncan, I.J.H., Moccia, R.D. 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience,  
1021 pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, 225-250. doi:  
1022 [10.1016/J.APPLANIM.2004.02.004](https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2004.02.004).  
1023
- 1024 Conte, F.S. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*,

- 1025 86, 205-223. doi: [10.1016/j.applanim.2004.02.003](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003).
- 1026
- 1027 Cottee, S.Y. 2012. Are fish the victims of ‘speciesism’? A discussion about fear, pain and  
1028 animal consciousness. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 5-15. doi: [10.1007/s10695-](https://doi.org/10.1007/s10695-010-9449-9)  
1029 [010-9449-9](https://doi.org/10.1007/s10695-010-9449-9)
- 1030
- 1031 Coyle, S.D., Durborow, R.M., Tidwell, J.H. 2004. *Anesthetics in Aquaculture*. Southern  
1032 Regional Aquaculture Center. SRAC Publication n° 3900.
- 1033
- 1034 Delbon, M.C., Paiva, M.J.T.R. 2018. Eugenol in tilapia juvenile: concentrations and successive  
1035 administrations. *Boletim do Instituto de Pesca*, [S.l.], 38, 43-52, nov. 2018. ISSN 1678-  
1036 2305. Available at: <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/941>.  
1037 Date accessed: 30 nov. 2020.
- 1038
- 1039 Erikson, U., Gansel, L., Frank, K., Svendsen, E., Digre, H. 2016. Crowding of Atlantic salmon  
1040 in net-pen before slaughter. *Aquaculture*, 465, 395-400;  
1041 [10.1016/j.aquaculture.2016.09.018](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.018).
- 1042
- 1043 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1985. Free radicals in biology and medicine. *Journal of Free*  
1044 *Radicals in Biology and Medicine*, 1, 331-332
- 1045
- 1046 Hastein, T., Scarfe, A.D., Lund, V.L. 2005. Science-base assessment of welfare: aquatic  
1047 animals. *Revue Scientifique et Technique de l’Office International des Epizooties*, 24,  
1048 529-547.
- 1049
- 1050 Honikel, K.O., Fischer, C.A. 1977. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine  
1051 muscles. *Journal of Food Science*, 42, 1633-1636. doi: [10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb08444.x)  
1052 [2621.1977.tb08444.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb08444.x).

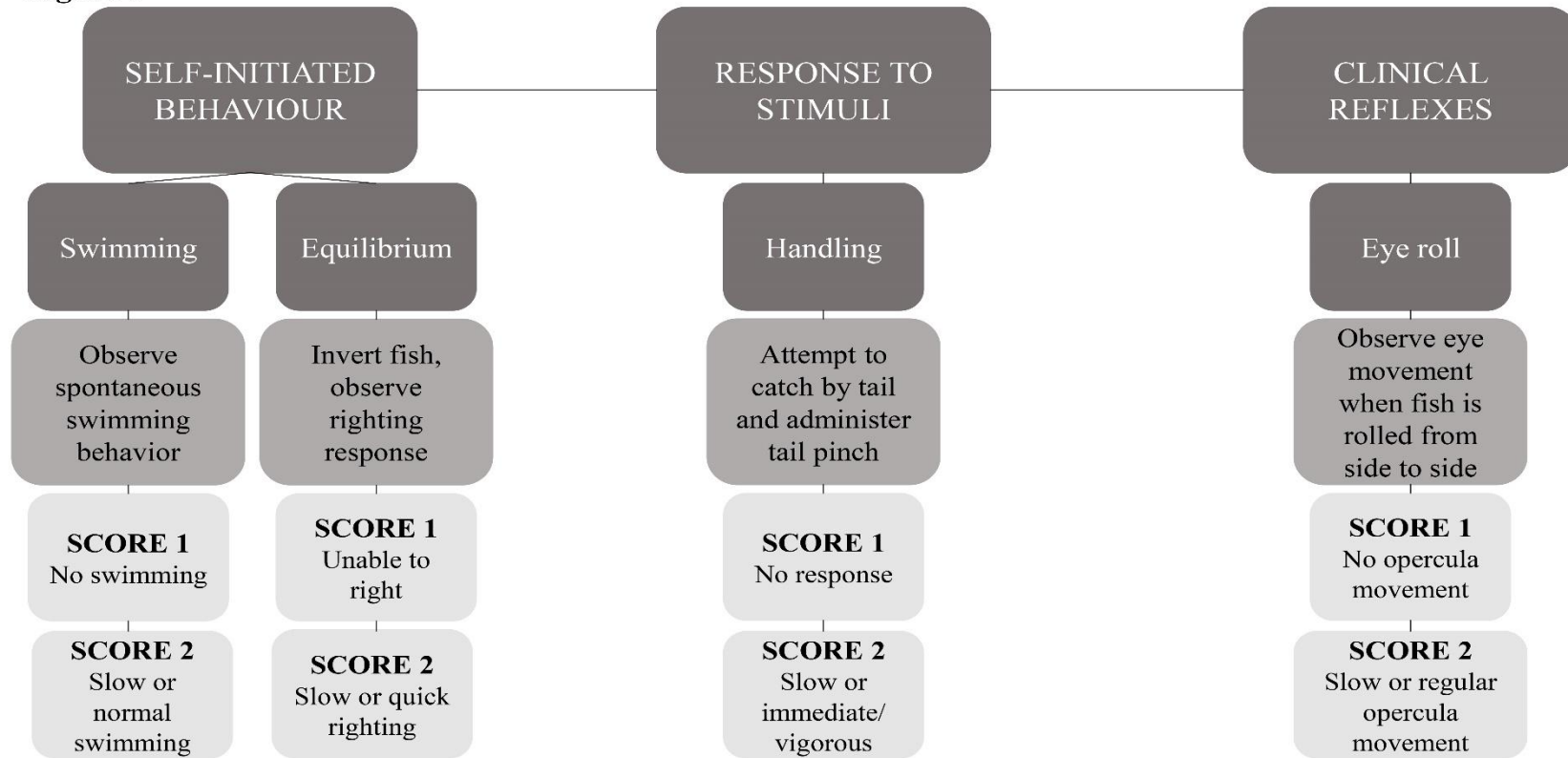
- 1053
- 1054 Kestin, S.C., van deVis, J.W., Robb, D.H.F. 2002. Protocol for assessing brain function in fish  
1055 and the effectiveness of methods used to stun and kill them. *Veterinary Record*, 150, 302-  
1056 307. doi: [10.1136/vr.150.10.302](https://doi.org/10.1136/vr.150.10.302).
- 1057
- 1058 Lines, J.A., Robb, D.H., Kestin, S.C., Crook, S.C., Benson, T. 2003. Electric stunning: a  
1059 humane slaughter method for trout. *Aquacultural Engineering*, 28, 141-154. doi:  
1060 [10.1016/S0144-8609\(03\)00021-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(03)00021-9).
- 1061
- 1062 Llonch, P., Lambooi, E., Reimert, H.G.M., Van De Vis, J.W. 2012. Assessing effectiveness of  
1063 electrical stunning and chilling in ice water of farmed yellowtail kingfish, common sole  
1064 and pike-perch. *Aquaculture*, 364-365, 143-149. doi: [10.1016/j.aquaculture.2012.08.015](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.015).
- 1065
- 1066 Lushchak, V.I. 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach.  
1067 *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 711-747. doi:[10.1007/s10695-015-0171-5](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5).
- 1068
- 1069 Maria Poli, B.M. 2009. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product  
1070 quality. *Italian Journal of Animal Science*, 8, 139-160. doi: [10.4081/ijas.2009.s1.139](https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s1.139).
- 1071
- 1072 Moreira, A.G.L., Coelho, A.A.C., Albuquerque, L.F.G., Moreira, R.T., Farias, W.R.L. 2015.  
1073 Efeito do eugenol como agente mitigador do estresse no transporte de juvenis de tilápia do  
1074 Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35, 893-898. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001100004)  
1075 [736X2015001100004](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001100004).
- 1076
- 1077 Nikinmaa, M. 2014. *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Elsevier.
- 1078
- 1079 Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S.; Bin - Hafeez 2003.  
1080 Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu*

- 1081 (Bl. & Schn.). Science of the Total Environment. BL, 309, 105-115. doi: [10.1016/S0048-](https://doi.org/10.1016/S0048-)  
1082 [9697\(03\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00006-8).  
1083
- 1084 Pedrazzani, A.S., Fernandes de Castilho, M., Carneiro, P.C.F., Molento, C.F.M. 2007. Bem-  
1085 estar de peixes e a questão da sciência. Archives of Veterinary Science, 12, 60-70.  
1086 Printed in Brazil. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v12i3.10929>.  
1087
- 1088 R Core Team 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for  
1089 Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>. Date  
1090 accessed: 12/15/2021  
1091
- 1092 Ramos, E.M., Gomide, L.A.M. 2007. Avaliação da qualidade de Carnes. Fundamentos e  
1093 Metodologias. Editora UFV. Viçosa. Minas Gerais, 2, 39-370.  
1094
- 1095 Robb, D.H.F., Kestin, S.C., Warriss, P.D. 2000. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh  
1096 colour and gaping in rainbow trout. Aquaculture, 182, 261-269. doi: [10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-)  
1097 [8486\(99\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00273-2).  
1098
- 1099 Roth, B., Slinde, E., Robb, D.H.F. 2007. Percussive stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*)  
1100 and the relation between force and stunning. Aquacultural Engineering, 36, 192-197. doi:  
1101 [10.1016/j.aquaeng.2006.11.001](https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.11.001).  
1102
- 1103 Roubach, R., Gomes, L.C., Leao Fonseca, F.A., Val, A.L. 2005. Eugenol as an efficacious  
1104 anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). Aquaculture Research, 36,  
1105 36 pp, 1056-1061. doi: [10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x).  
1106
- 1107 Simões, L.N., Gomes, L.C. 2009. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-  
1108 do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,

- 1109 61, 613-620.
- 1110
- 1111 Skjervold, P.O., Fjæra, S.O., Østby, P.B., Einen, O. 2001. Live-Chilling and crowding stress  
1112 before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192, 265-280.  
1113
- 1114 *Veterinary Record*, 150, 302-307. doi: /10.1016/S0044-8486(00)00447-6.  
1115
- 1116 Sneddon, L.U. 2009. Pain perception in fish: indicators and endpoints. *ILAR Journal*,  
1117 50, 338-342. doi: [10.1093/ilar.50.4.338](https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.338).  
1118
- 1119 Trushenski, J.T., Bowker, J.D., Gause, B.R., Mulligan, B.L. 2012. Chemical and Electrical  
1120 Approaches to Sedation of Hybrid Striped Bass: Induction, Recovery, and Physiological  
1121 Responses to Sedation'. *Transactions of the American Fisheries Society*, 141, 455-467.  
1122 doi: [10.1080/00028487.2012.664603](https://doi.org/10.1080/00028487.2012.664603).  
1123
- 1124 Viegas, E.M.M., Pimenta, F.A.; Previero, T.C., Gonçalves, L.U., Durães, J.P.; Ribeiro, M.A.R.,  
1125 Oliveira Filho, P.R.C. 2012. Métodos de abate e qualidade da carne de peixe,  
1126 Pirassununga, SP, 2012. In: *Zootec.* 61 (R): 41-50.  
1127
- 1128 Vargas Baldi, S.C., Parisi, G., Bonelli, A., Balieiro, J.C.C., Lapa Guimarães, J., Macedo Viegas,  
1129 E.M. 2018. Effects of different stunning/slaughter methods on frozen fillets quality of  
1130 cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 486, 107-113. doi:  
1131 [10.1016/j.aquaculture.2017.12.003](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.003).  
1132
- 1133 Winston, G.W., Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic  
1134 organisms. *Aquatic Toxicology*, 19, 137-161. doi: [10.1016/0166-445X\(91\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90033-6).

1135 **Figure 1:** Protocol for observing self-initiated behavior, stimulus-response, and clinical reflex post-stunning.

**Figure 1**



1136

1137 **Source:** Adapted from Kestin et al. (2002)

1138 **Table 1:** Frequency of insensitized (score 1) and non-insensitized (score 2) tilapia with respect to their swimming, balance, response to stimulus, and vestibulo-  
 1139 ocular reflex (VOR) behaviors in each of the three stunning methods, with and without the use of eugenol

		Stunning Methods					
		Electronarcosis		Medullary Section		Thermonarcosis	
		<i>Eugenol</i>		<i>Eugenol</i>		<i>Eugenol</i>	
	<i>Score</i>	<b>Without</b>	<b>With</b>	<b>Without</b>	<b>With</b>	<b>Without</b>	<b>With</b>
Swimming	1	3b	25a	24a	25a	24a	24a
	2	22a	0b	1b	0b	1b	1b
Balance	1	2b	25a	24a	25a	24a	24a
	2	23a	0b	1b	0b	1b	1b
Response to stimulus	1	0c	24a	23a	25a	20a	24a
	2	25a	1b	2b	0b	5b	1b
VOR	1	2c	24a	12b	23a	24a	25a
	2	23ab	1b	13b	2b	1c	0c

1140

1141

<sup>a-b</sup> Means followed by different lowercase letters in the same row differ from each other by Fisher's test at 5.0% probability ( $p \leq 0.05$ ).

1142 **Table 2:** Mean values of biochemical variables [glucose, lactate, rigor mortis (R-value), and  
 1143 glutathione (GSH) reductase] with respect to the interaction between the stunning method and  
 1144 eugenol treatment in tilapia

<b>Glucose (mg dL<sup>-1</sup>)</b>			
	Electronarcosis	Medullary Section	Thermonarcosis
Without Eugenol	85.96 ± 2.54Bb	95.10 ± 1.87Bb	139.00 ± 2.68Aa
With Eugenol	126.76 ± 2.41Aa	133.80 ± 1.67Aa	126.88 ± 3.29Aa
<b>*p-value interaction: 0.00053</b>			
<b>Lactate (mmol L<sup>-1</sup>)</b>			
	Electronarcosis	Medullary Section	Thermonarcosis
Without Eugenol	6.30 ± 0.10Bb	8.13 ± 0.25Aa	1.31 ± 0.04Ac
With Eugenol	10.72 ± 0.12Aa	5.82 ± 0.36Bb	0.82 ± 0.04Ac
<b>*p-value interaction: 0.00064</b>			
<b>R-Value</b>			
	Electronarcosis	Medullary Section	Thermonarcosis
Without Eugenol	1.33 ± 0.01Ba	0.86 ± 0.01Ab	0.92 ± 0.01Ab
With Eugenol	1.54 ± 0.01Aa	0.84 ± 0.01Ab	0.94 ± 0.01Ab
<b>*p-value interaction: 0.00037</b>			
<b>Glutathione reductase activity (µg of GSH mg protein<sup>-1</sup>)</b>			
	Electronarcosis	Medullary Section	Thermonarcosis
Without Eugenol	12.43 ± 0.34Aa	5.29 ± 0.05Ac	7.31 ± 0.05Ab
With Eugenol	9.08 ± 0.21Ba	5.10 ± 0.05Ac	7.28 ± 0.07Ab
<b>*p-value interaction: ≤ 0.00011</b>			

1145 a-b Means followed by different lowercase letters in the same row differ from each other. <sup>A-B</sup> means  
 1146 followed by different capital letters in the same column differ from each other by Tukey's test at 5.0%  
 1147 probability (p ≤ 0.05).

1148 **Table 3:** Average catalase values in the tilapia with respect to the different stunning methods, with and without the use of eugenol

Catalase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg de protein}^{-1}$ )							
Stunning Methods			Eugenol		*P-value		
Electronarcosis	Medullary Section	Thermonarcosis	Without	With	Stunning Methods	Eugenol	Interaction
0.61 $\pm$ 0.007a	0.26 $\pm$ 0.003c	0.35 $\pm$ 0.01b	0.44 $\pm$ 0.005	0.42 $\pm$ 0.002	0.00	0.24	0.31

1149 <sup>a-b</sup> Means followed by different lowercase letters in the same row differ from each other by Tukey's test at \*5.0% probability ( $p \leq 0.05$ ).

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A secção medular e a termonarcole demonstraram resultados aceitáveis no que diz respeito a alguns parâmetros de análises do bem-estar animal. Entretanto, a eletronarcole foi o método que apresentou maiores níveis de estresse aos animais, na maioria das análises. O eugenol foi eficaz ao avaliar os parâmetros comportamentais, demonstrando insensibilização total das tilápias.

De uma forma geral, nenhum método isolado foi completamente eficaz a fim de evitar o estresse desses animais no momento que antecede o abate. Recomenda-se estudos mais específicos para os métodos de secção medular e termonarcole, a fim de gerar menor tempo de exposição, respeitando sua fisiologia, reduzindo ao máximo o estresse ocasionado no momento pré-abate.