

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**EUGENOL NO MANEJO DE PINTADO AMAZÔNICO (*Pseudoplatystoma  
reticulatum* X *Leiarius marmoratus*) E NO TRANSPORTE DE ACARÁ-  
BANDEIRA (*Pterophyllum scalare*)**

**CRISLAINE PALMEIRA BARBOSA DE OLIVEIRA**

**SALVADOR - BA**

**OUTUBRO - 2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**EUGENOL NO MANEJO DE PINTADO AMAZÔNICO (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *Leiarius marmoratus*) E NO TRANSPORTE DE ACARÁ-BANDEIRA (*Pterophyllum scalare*)**

**CRISLAINE PALMEIRA BARBOSA DE OLIVEIRA**

**SALVADOR – BA  
OUTUBRO – 2018**

**CRISLAINE PALMEIRA BARBOSA DE OLIVEIRA**

**EUGENOL NO MANEJO DE PINTADO AMAZÔNICO**  
*(Pseudoplatystoma reticulatum X Leiarius marmoratus)* **E NO**  
**TRANSPORTE DE ACARÁ-BANDEIRA** *(Pterophyllum scalare)*

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Zootecnia.

Área de Concentração: Nutrição e produção de peixes.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Vítor Oliveira Vidal

**SALVADOR – BA**  
**OUTUBRO – 2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI - UFBA.

O48 Oliveira, Crislaine Palmeira Barbosa de  
Eugenol no manejo de pintado amazônico  
(*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) e no  
transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) / Crislaine  
Palmeira Barbosa de Oliveira – Salvador, 2018.

66f. : il

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Vítor Oliveira Vidal

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em  
Zootecnia) – Universidade Federal da Bahia. Escola de  
Medicina Veterinária e Zootecnia, 2018.

1. Aquicultura. 2. Anestesia. 3. Sedação. 4. Estresse I.  
Copatti, Carlos Eduardo. II. Vidal, Luiz Vítor Oliveira. III.  
Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU: 639

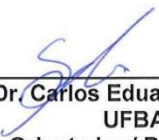
**EUGENOL NO MANEJO DE PINTADO AMAZÔNICO  
(*Pseudoplatystoma reticulatum* X *Leiarius marmoratus*) E NO  
TRANSPORTE DE ACARÁ-BANDEIRA (*Pterophyllum scalare*)**

Crislaine Palmeira Barbosa de Oliveira

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de  
Mestre em Zootecnia

Salvador, 26 de outubro de 2018

Comissão examinadora:



---

Dr. Carlos Eduardo Copatt  
UFBA  
Orientador / Presidente



---

Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati  
UFBA



---

Dr. José Fernando Bibiano Melo  
UNIVASF

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à toda  
minha família, pelo incentivo  
e aos ensinamentos herdados.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão é a virtude do sábio. E agradecer neste momento especial me concebe um momento de reflexão e de contemplação às atitudes daqueles que me rodearam ao longo destes dois anos. Começo agradecendo a Deus pelas bênçãos até às mais difíceis provações. Por me ensinar o caminho a seguir, por me conceder persistência e força.

À meus pais, meus irmãos e meus avós. Obrigada por me ensinar a ir em busca dos meus objetivos e a buscar conhecimentos em todas as situações. Jamais me perderei de tantas coisas grandiosas que me foram passadas durante toda a vida. À Neto, que me ajudou emocionalmente e amorosamente em todas as etapas de execução deste trabalho, pelo apoio, incentivo, dedicação, paciência e amor. À Dina, Antônio de Carvalho e Camila pelo carinho e estímulo que me foi transmitido durante estes dois últimos anos. À Elineize e Gabriel, impossível olhar para trás e não lembrar de todo amor, cumplicidade e ombro amigo que me foi dado. À Amanda pelo convívio e ombro amigo. À Livia, saiba que ao longo deste período conquistou meu respeito e a minha admiração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti, o qual foi o fio condutor para chegar até aqui. Pela orientação com sabedoria, dedicação e confiança que me foi dada. Sou imensamente grata pelos ensinamentos passados. Pelo exemplo de profissionalismo e honestidade. Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luiz Vítor, pelos ensinamentos, disponibilidade e auxílio concedido durante as etapas deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Estudo e Fisiologia da Fauna Aquática. Em especial ao Henrique, grande companheiro de laboratório. À Samantha, Iara, Jéssica, as quais participaram de várias etapas deste projeto. Ao Prof. Dr. Alberto por toda colaboração e aporte na execução do projeto. Ao Prof. Dr. Ricardo Albinati pelos ensinamentos e acompanhamento durante o estágio à docência. Ao Prof. Dr. Seldon por toda transmissão de conhecimento e colaboração, sou imensamente grata. Ao Laboratório de Aquicultura da UNIVASF, especialmente ao Altiery e o Prof. Dr. Bibiano. Ao Prof. Wasley, a Profa. Dra. Ana Catarina e ao técnico de laboratório Rogério. Ao Laboratório de Nutrição e Comportamento de Organismos Aquáticos da UFRB e ao Laboratório de Extensão em Análises Clínicas do Instituto de Farmácia da UFBA pelo aporte fornecido.

E o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFBA, por contribuir com minha formação profissional.

## LISTA DE FIGURAS

### **Capítulo 1 - Atividade anestésica de eugenol no manejo de pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*): Respostas bioquímicas e hematológicas.**

	<b>Página</b>
Figura 1. Curva de tempo para sedação (A) e anestesia (B) com uso de eugenol em juvenis de pintado Amazônico (n = 8). A: $y = 2007,6x^{-0,812}$ ; $R^2 = 0,468$ . B: $y = 52050,0x^{-1,45}$ ; $R^2 = 0,659$ .....	26
Figura 2. Efeito do eugenol ( $50 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre cortisol (A) e glicose do plasma (B) em juvenis de pintado Amazônico após 0, 1 e 5 h de estresse de manejo (1 min). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tempos em um mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão (n = 8 peixes por tratamento em cada tempo).....	27
Figura 3. Efeito do eugenol ( $50 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre proteínas totais (A), albumina (B), AST (C), ácido úrico (D) e ureia (E) do plasma em juvenis de pintado amazônico após 0, 1 e 5 h de estresse de manejo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tempos em um mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão (n = 8 peixes por tratamento em cada tempo).....	28

### **Capítulo 2 - Transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com uso de eugenol**

	<b>Página</b>
Figura 1. Curva de tempo para sedação (A) e anestesia (B) e recuperação anestésica com uso de eugenol em juvenis de acará-bandeira (n = 8 peixes por tratamento). A: $y = 245153x^{-2,22}$ ; $R^2 = 0,929$ . B: $y = 6525648,26x^{-2,79}$ ; $R^2 = 0,92$ ; C: $y = 30924x^{-0,615}$ ; $R^2 = 0,522$ .....	50
Figura 2. Efeito do eugenol ( $15 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre glicose sanguínea (A) e glicogênio muscular (B) em juvenis de acará-bandeira após transporte (0, 4 e 7 h).....	52



## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo 1 - Atividade anestésica de eugenol no manejo de pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*): Respostas bioquímicas e hematológicas.**

**Página**

Tabela 1. Efeito do eugenol ( $50 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ ), trombócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ), leucócitos totais ( $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ), linfócitos ( $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ), neutrófilos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ) e monócitos ( $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ) em juvenis de pintado amazônico após 0, 1 e 5 h de estresse de manejo..... 29

### **Capítulo 2 - Transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com uso de eugenol**

**Página**

Tabela 1. Efeito do eugenol nas variáveis de qualidade de água em juvenis de acará-bandeira após transporte (0, 4 e 7 h)..... 51

## SUMÁRIO

### **Eugenol no manejo de pintado amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *Leiarius marmoratus*) e no transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*)**

	<b>Página</b>
Resumo.....	01
Abstract.....	02
Introdução Geral.....	03
Revisão de Literatura Geral.....	04
Referências.....	09

### **Capítulo 1 - Atividade anestésica de eugenol no manejo de pintado amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*): respostas bioquímicas e hematológicas.**

Resumo.....	19
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	22
Resultados.....	26
Discussão.....	30
Conclusão.....	34
Agradecimentos.....	34
Referências.....	35

### **Capítulo 2 - Transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com uso de eugenol.**

Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	49
Discussão.....	52
Conclusão.....	54
Agradecimentos.....	54
Referências.....	54

Considerações Finais .....	59
----------------------------	----

**Eugenol no manejo de pintado amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *Leiarius marmoratus*) e no transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*)**

**RESUMO**

O eugenol é o principal composto químico do óleo de cravo, usualmente empregado na aquicultura para sedação e anestesia de peixes. O estudo objetivou avaliar o tempo de indução e recuperação anestésica em juvenis de pintado amazônico e acará-bandeira expostos a diferentes concentrações de eugenol e verificar sua efetividade no manejo de pintado amazônico e no transporte de acará-bandeira. Juvenis de pintado amazônico e acará-bandeira foram transferidos para aquários contendo diferentes concentrações de eugenol: 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Para a avaliação de eugenol no manejo de pintado amazônico, foi verificada sua efetividade através de variáveis bioquímicas e hematológicas. Para isto, os peixes foram divididos em dois grupos: anestesiados com 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol e não anestesiados, e avaliados em 0, 1 e 5 h após o manejo. Para a avaliação de eugenol no transporte de acará-bandeira, foi verificada sua efetividade através de variáveis bioquímicas (glicose e glicogênio) e de qualidade de água. Para isto, os exemplares foram divididos em dois grupos: sedados com 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol e não sedados e, avaliados em 4 e 7 h. A mínima concentração efetiva para sedação e anestesia em pintado amazônico ocorreu com o uso de 20 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol, respectivamente. Ocorreu 25 e 50 % de mortalidade nos tempos 0 e 1 h após o manejo no grupo controle. Os níveis plasmáticos de cortisol foram maiores em exemplares não anestesiados no tempo 0 h quando comparados a exemplares anestesiados no mesmo tempo e exemplares não anestesiados 5 h após o manejo ( $P < 0,05$ ). No grupo controle, os níveis plasmáticos de cortisol, glicose, proteína total e albumina foram significativamente menores no tempo 5 h após o manejo do estresse ( $P < 0,05$ ). Os valores de trombócitos e neutrófilos foram menores no grupo de peixes controle quando comparados aos peixes anestesiados nos tempos 1 e 5 h após o manejo do estresse, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Para acará-bandeira, os níveis de amônia total na água foram significativamente maiores no grupo controle no tempo 7 h do que em exemplares sedados no mesmo tempo ( $P < 0,05$ ). Os níveis de glicose sanguínea no grupo de exemplares sedados foram significativamente maiores em relação ao grupo controle no tempo 7 h ( $P < 0,05$ ). Conclui-se que, em pintado amazônico, o uso de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol é eficiente como anestésico e reduz o estresse de manejo e, em acará-bandeira, o uso de 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol é eficiente como sedativo para transporte de até 7 h.

**Palavras-chave:** anestesia, cortisol, glicose, mínima concentração efetiva, sedação

**Eugenol in Amazon catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *Leiarius marmoratus*) handling and in freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*) transport**

**ABSTRACT**

Eugenol is the main chemical compound of clove oil, usually used in aquaculture for sedation and fish anaesthesia. This study aimed to evaluate the effectiveness of eugenol for induction and anaesthesia recovery in Amazon catfish and freshwater angelfish juveniles and to verify its effects after handling stress and to verify its effectiveness in Amazon catfish handling and angelfish transport. Juveniles were transferred to aquariums containing different concentrations of eugenol: 0 (control), 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ . The evaluation of eugenol in Amazon catfish was verified through biochemical and haematological variables. The Amazon catfish were divided into two groups: anaesthetised with 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol and non-anaesthetised and they were evaluated at 0, 1 and 5 hours after handling stress. The evaluation of eugenol in angelfish transport was verified through biochemical (glucose and glycogen) and water quality variables. The angelfish were divided into two groups: sedated with 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol and non-sedated and they were evaluated at 4 and 7 h after transport. In Amazon catfish, the minimum effective concentration for sedation and anaesthesia occurred with the use of 20 and 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  of eugenol, respectively. In the control fish, 25 and 50% mortality occurred at 0 and 1 h after handling stress. Plasma cortisol levels were higher in control fish than anaesthetised fish 0 h after handling stress ( $P < 0.05$ ). Plasma AST and albumin levels were higher in control fish when compared to anaesthetised fish at 0 and 1 h after handling stress, respectively ( $P < 0.05$ ). In control fish, plasma cortisol, glucose, total protein and albumin levels were significantly lower at 5 h after handling stress ( $P < 0.05$ ). Thrombocyte and neutrophil values were lower in control fish when compared to anaesthetised fish at 1 and 5 h after handling stress, respectively ( $P < 0.05$ ). In freshwater angelfish, the water ammonia levels were significantly higher in the control group at 7 h after transport than in the sedated specimens at the same time ( $P < 0.05$ ). Blood glucose levels in the sedated fish were significantly higher in relation to control group 7 h after transport ( $P < 0.05$ ). The use of 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol is indicated as an anaesthetic for Amazon catfish and reduces post-handling stress and, the use of 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol in freshwater angelfish is indicated as a sedative in transport up to 7 h.

**Key words:** anaesthesia, cortisol, glucose, minimal effective concentration, sedation

## INTRODUÇÃO GERAL

Nos sistemas de produção aquícola, os peixes estão expostos a manejos rotineiros (arraçoamento, biometria, monitoramento da qualidade de água, despesca e transporte), inevitáveis e necessários para o andamento do cultivo. Cabe ressaltar que peixes submetidos a essas condições podem apresentar consequências indesejáveis, como o comprometimento do sistema imunológico e do desempenho animal (ADAMANTE et al., 2008), bem como problemas de saúde e mortalidade (ROSS e ROSS, 2008), prejudicando os ganhos de produção na aquicultura.

A utilização de anestésicos durante a manipulação de peixes é um procedimento usual na aquicultura e pode reduzir a ativação do eixo hipotalâmico hipofisário-intrarrenal (THOMAS e ROBERTSON, 1991). Durante o transporte, anestésicos em concentrações mais baixas atuam como sedativos, podendo reduzir a taxa metabólica, bem como a reação a estímulos externos (COOKE et al., 2004). Neste sentido, o uso de substâncias anestésicas minimiza o estresse e é potencial redutora de lesões durante o manejo e o transporte, contribuindo com o bem-estar dos peixes (PIRHONEN e SCHRECK, 2003). Contudo, deve-se considerar que a mesma substância anestésica pode exibir padrões de respostas distintas entre espécies de peixes, fase de desenvolvimento e condições ambientais. Assim, a descrição da eficácia anestésica é de fundamental importância (KING et al., 2005).

Estudos recentes têm demonstrado que a utilização de anestésicos naturais alternativos como óleo de cravo (eugenol) (SIMÕES et al., 2010). O qual tem demonstrado a eficiência anestésica em diferentes espécies de peixes, como tilápia (VIDAL et al., 2008), jundiá (DIEMER et al., 2012), pacu (ROTILI et al., 2012), bem como em espécies de peixes ornamentais, como o quinguio *Carassius auratus* (BITTENCOURT et al., 2012) e oscar *Astronotus ocellatus* (SILVA-SOUZA et al., 2015).

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o tempo de indução e recuperação anestésica em juvenis de pintado amazônico e acará-bandeira expostos a diferentes concentrações de eugenol e verificar sua efetividade na redução do estresse de manejo através de respostas bioquímicas e hematológicas em pintado amazônico e no transporte de acará-bandeira através de variáveis bioquímicas e de qualidade de água.

## REVISÃO DE LITERATURA GERAL

### Uso de anestésico na aquicultura

A anestesia é uma prática estratégica na aquicultura para realização de procedimentos de manipulação (reprodução, medicação e mudança de habitat) (PALIĆ et al., 2006). O uso de anestésicos em peixes tem sido apontado como estratégia para diminuir os efeitos prejudiciais causados pelo estresse. O qual pode ser minimizado através da diminuição da atividade do sistema nervoso central, reduzindo a capacidade de deslocamento animal. Assim, peixes anestesiados teriam maior facilidade para a execução de atividade rotineiras nas pisciculturas (SILVA-SOUZA et al., 2015).

Compostos anestésicos em baixas concentrações podem ser usados para sedar peixes durante o transporte. O uso destes sedativos antes e simultaneamente ao transporte é uma prática largamente empregada para reduzir o metabolismo e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio, bem como a produção de dióxido de carbono e amônia pelos peixes (HARMON, 2009; ROSS e ROSS, 1999). Dessa forma, os peixes poderiam suportar transportes por períodos mais longos.

No Brasil, inexistem leis de regulamentação quanto o uso de anestésicos. Nos Estados Unidos da América a Food and Drug Administration (FDA), autoriza somente o MS-222 como anestésico químico a ser utilizado em peixes, o qual não é produzido no Brasil (GOMES et al., 2001). A resolução 714, de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), autoriza a eutanásia de peixes com o uso de barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO<sub>2</sub>, triclaína metano sulfonato (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína e 2-fenoxietanol. No entanto, compostos químicos são de alto custo (MARKING e MEYER, 1985), além de provocarem efeitos colaterais, como alterações no sistema cardiovascular e endócrino, assim como na osmorregulação e regulação iônica (CARTER et al., 2011). Outro fator limitante é o risco de contaminação ambiental (LIMMA-NETTO et al., 2016). Dessa forma, tornou-se necessário a avaliação de novas substâncias, as quais sejam eficientes, seguras e de baixo preço, tornando-se alternativa para o uso de anestésicos sintéticos na aquicultura (ROUBACH et al., 2005).

O anestésico para ser considerado ideal deve produzir anestesia em três minutos ou menos, e permitir a recuperação dentro de cinco minutos. Adicionalmente, não deve causar toxicidade aos peixes e problemas de segurança nos manipuladores, o teor residual

no tecido deve ser baixo após o intervalo de segurança de uma hora ou menos, e deve apresentar custo razoável (MARKING e MEYER, 1985).

Efeitos de anestésicos são avaliados através de tempos de indução e recuperação. A indução e profundidade anestésica são divididas em estágios, os quais são determinados através da avaliação de comportamento, atividade, reflexos, tônus muscular, pressão arterial e frequências cardíaca e respiratória. Contudo, em peixes, tais indicadores de transição de um estágio para outro são de difíceis observações, pois muitas vezes é difícil diferenciar a passagem de um estágio de anestesia para outro, principalmente quando a transição é rápida. Assim, esta avaliação é descrita por alterações no equilíbrio, natação e reações a estímulos externos (Z AHL et al., 2012).

Há diversas classificações de estágios de indução e recuperação, sendo estes, diferidos pelas características comportamentais geradas. Small (2003), relata o processo anestésico em quatro estágios: sedação, perda parcial de equilíbrio, perda total de equilíbrio e colapso medular (morte). O processo anestésico compreende diversos componentes. Inicialmente há diminuição da sensibilidade, característica do estado de sedação, a qual é seguida pelo estado de anestesia geral, com perda de consciência e amnésia, que também provoca a imobilização e alívio da dor (Z AHL et al., 2012).

Em adição, a ação de compostos anestésicos varia de acordo com a espécie de peixe (Z AHL et al., 2009). Além disto, sua eficácia é afetada por fatores biológicos e ambientais. Os fatores biológicos que provocam alteração na taxa metabólica e farmacocinética dos compostos anestésicos são: espécie, idade, tamanho, peso, estado fisiológico e presença ou não de parasitas e doenças. Enquanto os fatores ambientais como temperatura e pH alteram o metabolismo de tais substâncias (BURKA et al., 1997).

### **Anestésicos alternativos na piscicultura – Eugenol**

Para peixes há diversos agentes que apresentam efeito anestésico, os quais são comumente divididos em agentes derivados ou não de plantas (HOSEINI et al., 2018). Óleos essenciais são metabolitos secundários de plantas aromáticas, sendo caracterizado como compostos naturais complexos, voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos (BAKKALI et al., 2008). São produtos extraídos de matéria-prima vegetal pelo método de arrase à vapor d'água e hidrodestilação ou expressão dos pericarpos de frutos cítricos, bem como outros métodos utilizados na indústria (MORAIS, 2009).

Com isto, estudos têm sido direcionados para avaliação destes compostos na anestesia de peixes, pois além de efeito anestésico, alguns possuem efeitos

antimicrobiano, antioxidante, aumento no sistema imunológico e redução o estresse. Assim, promovem efeito benéfico à saúde de peixes e sendo recomendados para indução anestésica (HOSEINI et al., 2018).

Em adição, estudos recentes têm demonstrado que a utilização de anestésicos naturais alternativos como óleo de cravo (eugenol) (BECKER et al., 2012), *Mentha* spp. (FAÇANHA e GOMES, 2005), *Cymbopogon flexuosus* (LIMMA-NETTO et al., 2016), *Lippia alba* (BECKER et al., 2012), *Ocimum basilicum* (LIMMA-NETTO et al., 2016), *Aloysia triphylla* (TEIXEIRA et al., 2017), *Aloysia gratíssima* (BENOVIT et al., 2015), *Ocimum gratissimum* (SILVA et al., 2012) e *Melaleuca alternifolia* (HAJEK, 2011), apresentaram resultados satisfatórios para diferentes espécies de peixes.

### **Eugenol**

O eugenol é um composto ativo derivado do óleo essencial de cravo, o qual é extraído das flores e caule do cravo-da-índia e é composto de 70-95% de eugenol (MAZZAFERA, 2003). Na busca por alternativas seguras para anestesia de peixes, o eugenol foi reconhecido por apresentar segurança para o meio ambiente e aos seres humanos, além de apresentar custos mais baixos e potencialidade anestésica, expandindo assim sua aplicabilidade como anestésico na aquicultura (MYLONAS et al., 2005). O eugenol atualmente é o anestésico alternativo mais promissor para peixes, sendo largamente utilizados em pesquisas científicas e no campo (YOUSEFI et al., 2018).

Estudos prévios já verificaram o efeito anestésico e fisiológico do eugenol em peixes (CHO e HEATH, 2000; SLADKY et al., 2001; NAVARRO et al., 2016), demonstrando sua eficácia. Por exemplo, em exemplares de Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), verificou-se que o óleo de cravo foi mais eficiente para mitigar respostas ao estresse do que o MS-222 (FENG et al., 2011). Resultados similares foram verificados em catfish híbrido *Pseudoplatystoma metaense* × *Leiarius marmoratus* (SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2014), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (VIDAL et al., 2006) e, bagre-africano *Clarias gariepinus* (ÖGRET MEN e GÖKÇEK, 2013). Além disso, eugenol também se demonstrou eficiente e seguro para sedação, indução e recuperação anestésica em acará-bandeira (HEKIMOĞLU e ERGUN, 2012).

Adicionalmente, eugenol pode ser utilizado como sedativo para peixes. A sedação é preferível em algumas situações de manejo nas pisciculturas, sobretudo no transporte de peixes vivos (COOKE et al., 2004). Neste sentido, já foi demonstrado que o óleo de



cravo atenuou os níveis de cortisol plasmático no transporte de salmão do atlântico (*Salmo salar* L.) (IVERSEN et al., 2003) e glicose plasmática no transporte de tilápia azul (*Oreochromis aureus*) (AKAR, 2011).

### **Estresse em peixes**

Nos sistemas de produção aquícolas os peixes estão expostos a manejos rotineiros (arraçoamento, biometria, monitoramento da qualidade de água, despesca e transporte), inevitáveis e necessários para o bom andamento do cultivo (BARCELLOS et al., 2000). Contudo, são potenciais causadores de estresse. Pois causam importantes alterações fisiológicas e comportamentais à saúde dos peixes (CAN et al., 2018).

Peixes submetidos a agentes estressores podem apresentar consequências indesejáveis, como o comprometimento do sistema imunológico e desempenho animal (ADAMANTE et al., 2008), bem como problemas de saúde e mortalidade (ROSS e ROSS, 2008) o que, conseqüentemente, ocasiona perdas econômicas (CAN et al., 2018). São tidos como estressores quaisquer estímulos que causem alterações comportamentais e fisiológicas, prejudicando a alimentação, crescimento e reprodução animal (ROSS e ROSS, 2008). Como, por exemplo, manejos biométricos, amostragens, triagens, manuseio, transporte, dentre outros (PARODI et al., 2014; HOSEINI et al., 2018).

Há três níveis de respostas fisiológicas geradas por agentes estressores, sendo divididas em resposta ao estresse primária, secundária e terciária (PICKERING e POTTINGER, 1995; BARTON, 1997). As respostas primárias são hormonais, caracterizadas pelo aumento inicial dos níveis plasmáticos de catecolaminas seguido pelo aumento de cortisol plasmático (PANKHURST, 2011). Já as respostas secundárias são mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos causadas pelos efeitos destes hormônios no sangue ou a nível tecidual, como o aumento dos batimentos cardíacos e absorção de oxigênio e desequilíbrio no balanço hidromineral. Enquanto as respostas terciárias comprometem desempenho, reprodução e sistema imunológico (LIMA et al., 2006).

### **Pintado Amazônico**

Na aquicultura, programas de hibridização têm como finalidade o desenvolvimento de animais com características desejáveis aos sistemas de cultivo, o qual apresentem desempenho superior às espécies parentais (vigor híbrido ou heterose positiva), melhoria do sistema imunológico e da qualidade da carne (BARTLEY et al.,

2001). Atualmente a produção de peixes híbridos tem tornado frequente nos sistemas de produção aquícola, fato atribuído a aceitabilidade no mercado nacional e internacional (PÁDUA et al., 2012). Neste cenário, o pintado Amazônico, híbrido resultante do cruzamento entre a fêmea de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e o macho de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*), se destaca como um dos híbridos com maior potencial para comercialização (VENTURA et al., 2013).

O cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann e Eigenmann, 1889), ocorre comumente nas principais Bacias Hidrográficas da América do Sul. É um peixe migratório e está entre as maiores espécies destas Bacias, sendo um reconhecido predador (BIGNOTTO et al., 2009). O jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*), por sua vez, ocorre nas Bacias Hidrográficas dos rios Amazonas, Essequibo e Orinoco, atingindo peso aproximado de 12 kg, e possui hábito alimentar onívoro (FERRARIS JUNIOR, 2007).

O pintado amazônico apresenta superioridade zootécnica em relação às espécies parentais, devido ao seu rápido crescimento e técnicas mais simplificadas nos manejos produtivos durante a fase de alevinagem. Além disto, o processo de hibridização possibilitou maior facilidade de produção, aceitabilidade quanto ao consumo de ração, maior versatilidade no hábito alimentar e tolerância a sistemas de produção intensivos, bem como baixos níveis de oxigênio dissolvido (KUBITZA et al., 2011). Outra característica deste híbrido é a sua preferência por águas com pH ácido (4,5), proporcionando em ambiente de cultivo maior taxa de crescimento (LE MOS et al., in press).

### **Acará-bandeira**

O acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) (Schultze, 1823) é uma espécie pertencente à família Cichlidae, nativa da Amazônia. São animais que apresentam alta demanda e valor econômico, visto que são apreciados pela beleza, alta capacidade reprodutiva e tolerância a sistemas de cultivo (KARAYUCEL et al., 2006). Além disto, está entre as espécies de peixe ornamental dulcícola mais comercializadas no mundo (RIBEIRO et al., 2009).

Esta espécie possui características morfológicas marcantes, com corpo triangular comprido nas laterais, nadadeiras ventrais com espessura fina, modificadas e com comprimento extenso e, as nadadeiras dorsal e anal longas (RIBEIRO et al., 2007). Na natureza, alimentam-se de diversas espécies de invertebrados e protozoários (DEGANI, 1993). Em cativeiro, tem boa aceitabilidade de dietas artificiais (LUNA-FIGUEROA et

al., 2000). Atualmente há diversas linhagens de acará-bandeira no mercado como: koi, marmorato, negro, ouro, leopardo, palhaço e fumaça. Outra característica desta espécie é sua preferência por águas com pH levemente ácido e baixa dureza. Na natureza, estabelecem ordem hierárquica e podem alcançar comprimento de 15 cm (RIBEIRO et al., 2007).

As características reprodutivas do acará-bandeira são marcadas pelo cuidado parental e pela territorialidade. Em cativeiro, a reprodução é iniciada após a aproximação e posterior formação de casal. Exercem a corte e a desova. Com a desova, é iniciado o cuidado parental, o qual é realizada pelo macho e fêmea, e estendido até a eclosão e proteção das larvas (CACHO,1999). Contudo, essa espécie é muito sensível ao estresse de manejo e às condições de qualidade de água, o que pode comprometer sua sobrevivência, crescimento, sistema imunológico e pigmentação (NOROUZITALLAB et al., 2009), durante atividades de manejo e transporte.

## REFERÊNCIAS

ADAMANTE, W.B.; NUÑER, A.P.O.; BARCELLOS, L.J.G.; SOSO, A.B.; FINC, J.A. Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and times of transportation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 755–761, 2008.

AKAR, A.M.A. Effects of clove oil on the response of Blue Tilapia (*Oreochromis Aureus*) by transportation Stress. **Journal of the Arabian Aquaculture Society**, v. 6, 2011.

BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEHL, V.M. Estresse em peixes: Fisiologia da Resposta ao Estresse, Causas e Consequências (Revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, p. 99–111, 2000.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARTLEY, D.M.; RANA, K.; IMMINK, A.J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 325–337, 2001.

BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: IWANA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (eds) *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; HELDWEIN, C.G.; ZEPPENFELD, C.C.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 789–796, 2012.

BENOVIT, S.C.; SILVA, L.L.; SALBEGO, J.; LORO, V.L.; MALLMANN, C.A.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E.M.M.; HEINZMANN, B.M. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 87, p. 1675–1689, 2015.

BIGNOTTO, T.S.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; MANIGLIA, T.C.; BONI, T.A.; LUCIO, L.C.; GOMES, V.N.; PRIOLI, R.A.; OLIVEIRA, A.V.; JÚLIO-JUNIOR, H.F.; PRIOLI, L.M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 681–689, 2009.

BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; RORATO, R.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H. Benzocaine and eugenol as anesthetics for golden fish (*Carassius auratus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1597-1602, 2012.

BURKA, J.F.; HAMMELL, K.L.; HORSBERG, T.E.; JOHNSON, G.R.; RAINNIE, D.J.; SPEARE, D.J. Drugs in Salmonid aquaculture – A review. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 20, p. 333–349, 1997.

CACHO, M.S.R.F.; YAMAMOTO, M.E.; CHELLAPPA, S. Comportamento reprodutivo do acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Cuvier e Valenciennes (Osteichthyes, Cichlidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 653–664, 1999.

CAN, E.; KIZAK, V.; CAN, S.S.; ÖZÇİÇEK, E. Anesthetic potential of geranium (*Pelargonium graveolens*) oil for two cichlid species, *Sciaenochromis fryeri* and *Labidochromis caeruleus*. **Aquaculture**, v. 491, p. 59–64, 2018.

CARTER K.M.; WOODLEY, C.M.; BROWN, R.S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews Fish Biology Fisheries**, v. 21, p.51–59, 2011.

CHO G. K.; HEATH D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and oil clove anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Walbam). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 537–546, 2000.

COOKE, S.J.; SUSKI, C.D.; OSTRAND, K.G.; TUFTS, B.L.; WAHL, D.H. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 239, p. 509–529, 2004.

DEGANI, G. Growth and body composition of juveniles of *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces; Cichlidae) at different densities and diets. **Aquaculture research**, v. 24, p. 725–730, 1993.

DIEMER, O.; NEU, D.H.; BITTENCOURT, F.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. Eugenol as anesthetic for silver catfish (*Rhamdia voulezi*) with different weight. **Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1495-1500, 2012.

FAÇANHA, M.F., GOMES, L.C. Efficacy of menthol as an anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 35, p.71–75, 2005.

FENG, G.; ZHUANG, P.; ZHANG, L.; KYNARD, B.; SHI, X.; DUAN, M.; LIU, J.; HUANG, X. Effect of anaesthetics MS-222 and clove oil on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, p. 595–599, 2011.

FERRARIS JUNIOR, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (*Osteichthyes: Siluriformes*), and catalogue of *siluriform* primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1–628, 2007.

GOMES, L.C. CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426–431, 2001.

HAJEK G.J. The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 296–300, 2011.

HARMON, T.S. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p. 58–66, 2009.

HEKIMOĞLU, M.A.; ERGUN, M. Evaluation of clove oil as anaesthetic agent in fresh water angelfish, *Pterophyllum scalare*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, p. 1297–1300, 2012.

HOSEINI, S.M.; TAHERI MIRGHAED, A.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 0, p. 1–15, 2018.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY; ELIASSEN, R. The efficacy of metomidate, clove oil, aquis and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stressreducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549–566, 2003.

KARAYUCEL, I.; ORHAN, A.K.; KARAYUCEL, S. Effect of different level of 17 a methyltestosterone on growth and survival of angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Journal of Animal Veterinary Advance**, v. 5, p. 244–24, 2006.

KING, V.W.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S.; BENTON, C.; BERLINSKY, D.L. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for

inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1442–1449, 2005.

KUBITZA, F.; ONO, E.A.; CAMPOS, J.L. Alguns destaques da piscicultura em 2011. **Panorama da aquicultura**, v. 21, p. 14–23, 2011.

LEMOS, C.H.P.; CHUNG, S.; RIBEIRO, C.V.M.; COPATTI, C.E. Growth and biochemical variables in Amazon catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) under different water pH. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, In press.

LIMMA-NETTO, J.D.; SENA, A.C.; COPATTI, C.E. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, p. 727–733, 2016.

LUNA-FIGUEROA, J.; FIGUEROA-TORRES, J.; HERNÁNDEZ DE LA ROSA, L.P. Efecto de alimentos con diferente contenido proteico en la reproducción del pez ángel *Pterophyllum scalare* variedad perlada (Pises: Cichlidae). **Ciencia y Mar**, v. 4, p. 3–9, 2000.

MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2–5, 1985.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 231–238, 2003.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467–481, 2005.

NAVARRO, R.D.; FRANÇA, R.P.; PALUDO, G.R.; BIZARRO, Y.W.S.; SILVA, R.F.; NAVARRO, F.K.S.P. Physiological and hematological responses of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) to different anesthetics during simulated transport conditions. **Acta Scientiarum Technology**, v. 38, p. 301–306, 2016.

NOROZITALLAB, P.; FARHANGI, M.; BABAPOUR, M.; RAHIMI, R.; SINHA, A.K.; BARUAH, K. Comparing the efficacy of dietary  $\alpha$ -tocopherol with that of DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate, both either alone or in combination with ascorbic acid, on growth and stress resistance of angelfish, *Pterophyllum scalare*, juveniles. **Aquaculture International**, v. 17, p. 207–216, 2009.

ÖGRET MEN, F.; GÖKÇEK, K. Comparative efficacy of three anesthetic agents on juvenile african catfish, *clarias gariepinus* (burchell, 1822). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 13, p. 51–56, 2013.

PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M.; KASAI, R.Y.D.; JERÔNIMO, G.T.; CARRIJO-MAUAD, J.R. Parasitic infestations in hybrid surubim catfish fry (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, p. 235–240, 2012.

PALIĆ, D.; HEROLT, D.M.; ANDREASEN, C.B.; MENZEL, B.W.; ROTH J.A. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 820). **Aquaculture**, v. 254, p. 675–685, 2006.

PANKHURST, N.W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, p. 265–275, 2011.

PARODI, T.V.; CUNHA, M.A.; BECKER, A.G.; ZEPPEFELD, C.C.; MARTINS, D.I.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 323–334, 2014.



PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. Environmental and ecological biochemistry. Amsterdam: Elsevier, p.349–379, 1995.

PIRHONEN, J.; SCHRECK, C.B. Effects of anesthesia with MS-222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 220, p. 507–514, 2003.

RIBEIRO, F.A.S.; PRETO, B.L.; FERNANDES, J.B.K. Sistemas de criação para o acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Acta Scientiarum**, v. 30, p. 459–466, 2009.

RIBEIRO, F. A. S.; RODRIGUES, L. A.; FERNANDES, J. B. K. Desempenho de juvenis de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com diferentes níveis de proteína bruta na dieta. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 33, p. 195–203, 2007.

ROSS, L.G.; B. ROSS. Anaesthesia of fish. In: ROSS, L. G.; ROSS, B. editors. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 58–88, 1999.

ROSS, L.G.; ROSS, B., 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3rd ed. Blackwell Publishing, Oxford.

ROTILI, D.A.; DEVENS, M.A.; DIEMER, O.; LORENZ, E.K.; LAZZARI, R.; BOSCOLO, W.R. Eugenol as anesthetic for *Piaractus mesopotamicus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, p. 288–294, 2012.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1056–1061, 2005.

SILVA-SOUZA, J.G.; ANDRADE, D.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; FARIAS, W.M.; VALÉRIO JÚNIOR, J.F.; MENDONÇA, P.P. Eugenol como anestésico para oscar, *Astronotus ocellatus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, p. 205–210, 2015.

SILVA, L.L.; PARODI, T.V.; RECKZIEGEL, P.; GARCIA, V.O.; BURGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; MALMANN, C.A.; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350, p. 91–97, 2012.

SIMÕES, L.N.; PAIVA, G.; GOMES, L. C. Óleo de cravo como anestésico em adultos de tilápia-do-nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, p. 1472-1477, 2010.

SLADKY, K.K.; SWANSON, C.R.; STOSKOPF, M.K.; LOOMIS, M.R.; LEWBART, G.A. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachipomus*). **American journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 337–342, 2001.

SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p. 177–185, 2003.

SUÁREZ-MARTÍNEZ, R.O.; BERNAL-BUITRAGO, G.F.; VELASCO-GARZÓN, J.S.; PINZÓN-DAZA, M.A.; ESLAVA-MOCHA, P.R.; BALDISSEROTTO, B. Eugenol as an anesthetic for handling Hybrid *Pseudoplatystoma metaense* by *Leiarius marmoratus*. **Orinoquia Suplemento**, v. 18, p. 256–259, 2014.

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 3383–3392, 2017.

THOMAS, P.; ROBERTSON, L. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. **Aquaculture**, v. 96, p. 69–86, 1991.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T. R.A.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, p. 1069-1074, 2008.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; MECÊDO, G.R. The use of eugenol as an anaesthetic for the handling of Pintado juveniles (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, p. 275–279, 2006.

VENTURA, A.S.; JERÔNIMO, G.T.; GONÇALVES, E.L.T.; TAMPOROSKI, B.R.; MARTINS, M.L.; ISHIKAWA, M.M. Fauna parasitária dos híbridos siluriformes cachapinta e jundiara nos primeiros estágios de desenvolvimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 943-949, 2013.

ZAHL, I.H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O.B.; HANSEN, M.K.; Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of bodyweight, temperature and stress. **Aquaculture**, v. 295, p. 52–59, 2009.

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

YOUSEFI, M.; HOSEINI, S.M.; VATNIKOV, Y.A.; NIKISHOV, A.A.; KULIKOV, E.V. Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. **Aquaculture**, v. 495, p. 376–383, 2018.

## CAPÍTULO 1

---

**Atividade anestésica de eugenol no manejo de pintado amazônico  
(*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*): Respostas  
bioquímicas e hematológicas**

**Atividade anestésica de eugenol no manejo de pintado amazônico**  
*(Pseudoplatystoma reticulatum x Leiarius marmoratus): respostas bioquímicas e*  
**hematológicas**

**RESUMO**

O estudo objetivou avaliar o efeito de eugenol para indução e recuperação anestésica em juvenis de pintado amazônico e verificar sua efetividade na redução do estresse de manejo. Juvenis foram transferidos para aquários contendo diferentes concentrações de eugenol: 0 (controle), 10, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os peixes foram divididos em dois grupos: anestesiados com 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol e não anestesiados, e avaliados em 0, 1 e 5 horas após o estresse de manejo através de variáveis bioquímicas e hematológicas. A mínima concentração efetiva para sedação e anestesia ocorreu com o uso de 20 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol, respectivamente. Ocorreu 25 e 50 % de mortalidade nos tempos 0 e 1 h após o manejo no grupo controle. Os níveis plasmáticos de cortisol foram maiores em peixes no grupo controle do que os anestesiados no tempo 0 h após o estresse ( $P < 0,05$ ). Os níveis plasmáticos de AST e albumina foram maiores nos peixes no grupo controle quando comparados aos peixes anestesiados nos tempos 0 e 1 h após o manejo do estresse, respectivamente ( $P < 0,05$ ). No grupo controle, os níveis plasmáticos de cortisol, glicose, proteína total e albumina foram significativamente menores no tempo 5 h após o manejo do estresse ( $P < 0,05$ ). Os valores de trombócitos e neutrófilos foram menores no grupo de peixes controle quando comparados aos peixes anestesiados nos tempos 1 e 5 h após o manejo do estresse, respectivamente ( $P < 0,05$ ). O uso de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol é indicado como anestésico para o pintado da Amazônia e reduz o estresse pós-manipulação, reduzindo a mortalidade, melhorando as respostas bioquímicas e promovendo o aumento da defesa do sistema imunológico.

**Palavras-chave:** cortisol, estresse de manejo, recuperação anestésica, sedação, variáveis hematológicas

**Anaesthesia with eugenol in the amazon catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) handling: biochemical and haematological responses**

**ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the effectiveness of eugenol for induction and anaesthesia recovery in Amazon catfish juveniles and to verify its effects in reducing handling stress. Juveniles were transferred to aquariums containing different concentrations of eugenol: 0 (control), 10, 20, 30, 40, 50 and 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ . The fish were divided into two groups: anaesthetized with 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol and non-anaesthetized, and they were evaluated at 0, 1 and 5 hours after handling stress through biochemical and haematological variables. The minimum effective concentration for sedation and anaesthesia occurred with the use of 20 and 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  of eugenol, respectively. In the control fish, 25 and 50% mortality occurred at 0 and 1 h after handling stress. Plasma cortisol levels were higher in control fish than anaesthetized fish at 0 h after handling stress ( $P < 0.05$ ). Plasma AST and albumin levels were higher in control fish when compared to anaesthetized fish at 0 and 1 h after handling stress, respectively ( $P < 0.05$ ). In control fish, plasma cortisol, glucose, total protein and albumin levels were significantly lower at 5 h after handling stress ( $P < 0.05$ ). Thrombocyte and neutrophils values were lower in control fish when compared to anaesthetized fish at 1 and 5 h after handling stress, respectively ( $P < 0.05$ ). The use of 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol is indicated as an anaesthetic for Amazon catfish and reduces post-handling stress by reducing mortality, improving biochemical responses and promoting increased immune defence system.

**Key-words:** anaesthetic recovery, cortisol, haematological variables, handling stress, sedation

## INTRODUÇÃO

O uso de anestésicos nos sistemas de produção piscícola é uma estratégia que visa minimizar fatores de indução ao estresse, como hipermotilidade e percepção de estímulos adversos (temperatura, luz e confinamento), principalmente no manejo (desova, amostragem, reprodução artificial, vacinação, vacinação e cirurgia) e transporte (INOUE et al., 2005; SENA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2017; BAHÍ et al., 2018). Dessa forma, o uso de anestésicos na piscicultura pode evitar prejuízos devido à perda de apetite, redução no crescimento, comprometimento do sistema imunológico, aumento da vulnerabilidade a patógenos e, conseqüentemente, doenças infecciosas e morte dos organismos (BARCELLOS et al., 2001; INOUE et al., 2005).

Situações estressantes desencadeiam alterações em respostas comportamentais, hematológicas e bioquímicas (EL-SAYED et al., 2007). Peixes submetidos a situações estressantes apresentam um conjunto sequencial de respostas fisiológicas. As respostas primárias ocorrem em nível neuroendócrino, com mecanismos de alarme dos sistemas biológicos que resulta em resposta neuroquímica, havendo liberação de catecolaminas e corticosteroides. Respostas secundárias são mudanças nos parâmetros fisiológicos, metabólicos e osmorregulatórios resultantes da ação neuroendócrina. Enquanto as respostas terciárias têm como características a perda da capacidade adaptativa, exaustão dos sistemas biológicos e comprometimento do desempenho de crescimento, da reprodução e do sistema imunológico (MOMMSEN et al., 1999; BARCELLOS et al., 2001; PANKHURST, 2001).

Neste sentido, o cortisol plasmático é utilizado como indicador de estresse primário em peixes, pois é o principal corticosteroide liberado em situação de estresse (MOMMSEN et al., 1999). A glicose plasmática, por sua vez, é a variável mais utilizada dentre os indicadores de estresse de efeito secundário (MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011). As análises hematológicas são eficazes para avaliar processos corporais e capacidade de defesa imunológica. Com isso, as análises hematológicas podem ser utilizadas como instrumento de mensuração de bem-estar e para estabelecer diagnósticos acerca de distúrbios metabólicos em peixes (HOSSAIN et al., 2016; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Eugenol é um dos anestésicos mais utilizados em peixes, sendo o principal composto químico derivado do óleo essencial de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) (MAZZAFERA, 2003). Estudos prévios têm demonstrado que o mesmo é eficiente e

seguro na indução e recuperação anestésica de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (VIDAL et al., 2008), jundiá (*Rhamdia voulezi*) (DIEMER et al., 2012), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (ROTILI et al., 2012), quinguio (*Carassius auratus*) (BITTENCOURT et al., 2012) e oscar (*Astronotus ocellatus*) (SILVA-SOUZA et al., 2015). Contudo, tais espécies comportam-se de forma distinta quanto a concentração e o tempo de indução e recuperação anestésica.

O pintado Amazônico é um híbrido desenvolvido na década de 1990 no Brasil, resultante do cruzamento entre a fêmea de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e o macho de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*). De acordo com Prieto-Guevara et al. (2015), as espécies parentais ocorrem comumente nas principais Bacias Hidrográficas da América do Sul e o processo de hibridização favorece a comercialização, devido a superioridade zootécnica do híbrido em relação as espécies parentais. Apesar de sua importância comercial, inexistem estudos relacionados à anestesia de manejo em pintado amazônico. Considerando a existência de variação abrupta relacionada à concentração e ao tempo de exposição anestésica efetiva entre espécies de peixes, este estudo objetivou avaliar o tempo de indução e recuperação anestésica em juvenis de pintado Amazônico expostos a diferentes concentrações de eugenol e verificar a sua efetividade na redução do estresse de manejo através de variáveis bioquímicas e hematológicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e condições experimentais**

Os procedimentos experimentais ocorreram no Laboratório de Nutrição e Comportamento de Organismos Aquáticos do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, Brasil. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (nº 41-2017). Foram utilizados exemplares juvenis de pintado Amazônico provenientes da piscicultura da região.

Durante os experimentos, as variáveis de qualidade de água foram monitoradas para temperatura ( $26,5 \pm 0,6$  °C) e oxigênio dissolvido ( $8, 10 \pm 0,18$  mg L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>) com oxímetro (DO-48), pH ( $7,5 \pm 0,02$ ) com pHmetro (mPA-210P) e, amônia total ( $0,10 \pm 0,03$  mg L<sup>-1</sup> N-NH<sub>3</sub>), alcalinidade ( $35 \pm 1,44$  mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) e dureza ( $80 \pm 0,00$  mg L<sup>-1</sup>



CaCO<sub>3</sub>) com kit comercial (Alfatecnoquímica, Florianópolis, SC, Brasil). Previamente aos testes, os animais foram mantidos em tanques de 2000 L em sistema de recirculação com aeração constante e filtração biológica, onde passaram por um período de aclimação de 15 dias. Durante esse período, os animais foram arraçoados diariamente, três vezes ao dia, com dieta comercial (320 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta e 3500 kcal de energia digestível, Purina Nutripeixe SI). O arraçoamento foi suspenso 24 horas antes de cada experimento.

### **Indução e recuperação anestésica**

Para determinar a influência da concentração de eugenol na indução e recuperação anestésica foram utilizados 64 juvenis de pintado Amazônico (81,02 ± 3,56 g e 23,03 ± 0,28 cm; n = 8 para cada concentração testada). Os exemplares foram transferidos para aquários contendo 4 L de água e eugenol (Biodinâmica, Ibiporã-PR, Brasil) em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µL L<sup>-1</sup> (diluído 1:10 com etanol 99,9%). As concentrações foram primeiramente diluídas em etanol (1:10). No grupo controle, os peixes foram transferidos para aquários com apenas água e etanol proporcional a maior concentração de eugenol utilizada para 60 µL L<sup>-1</sup> (540 µL L<sup>-1</sup> de etanol). Também foi realizado um grupo controle contendo somente água. Para avaliação do tempo de indução anestésica, em cada aquário foram colocados dois peixes simultaneamente. O período de avaliação foi de até 30 minutos e cada peixe foi usado apenas uma vez (adaptado de SENA et al., 2016).

A sedação (perda parcial de equilíbrio sem resposta a estímulos) e a anestesia (perda total de equilíbrio sem resposta a estímulos) foram avaliadas. Para verificação do tempo de recuperação anestésica, os exemplares foram transferidos para aquários com 4 L de água (sem eugenol). Os peixes foram considerados recuperados quando responderam a estímulos externos e apresentaram natação similar aos exemplares do grupo controle (adaptado de SMALL et al., 2003). A sobrevivência foi monitorada até 72 h após a indução anestésica.

### **Manejo e biometria**

Os exemplares de pintado Amazônico (112,27 ± 6,19 g e 25,06 ± 0,43 cm; n = 48) foram anestesiados com 50 µL L<sup>-1</sup> de eugenol diluído em etanol a 99,9% (1:10) (essa foi a menor concentração para induzir anestesia dentro de 2–3 minutos, ver os resultados) em um aquário de 4 L (um peixe de cada vez).

Após a indução anestésica, procedeu-se a biometria dos peixes, com exposição ao ar por 1 minuto. Posteriormente, foi realizada coleta de sangue no tempo 0 h de oito exemplares. Os 16 peixes restantes ( $n = 8$  para cada tempo de avaliação) foram acondicionados em 2 tanques de 250 L (8 indivíduos tanque<sup>-1</sup>). Amostras de sangue foram coletadas de oito peixes do primeiro tanque uma hora após a anestesia e de outros oito peixes do segundo tanque cinco horas após a anestesia. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos do grupo teste, contudo, sem a exposição ao eugenol (adaptado de TEIXEIRA et al., 2017). Posterior aos testes, foi realizado o monitoramento de sobrevivência até 72 h.

### **Coleta das amostras de sangue**

Após a biometria, foram coletadas duas alíquotas de sangue por meio de punção venocaudal utilizando seringa estéril com 10  $\mu$ L de heparina 5.000 UI. A primeira alíquota de 1,0 mL foi utilizada para obtenção de plasma para as análises bioquímicas e, a segunda alíquota, de 0,5 mL, para análise hematológica. Ambas as alíquotas foram transferidas para microtubos de polietileno de 2,5 mL para análises posteriores. A primeira alíquota foi coletada de todos os exemplares e a segunda alíquota foi coletada de quatro exemplares de cada tratamento (com ou sem eugenol) em cada tempo (0, 1 e 5 h).

Para as análises bioquímicas, o sangue foi centrifugado a 3000 X g (15 minutos) para obtenção do plasma. E as amostras foram refrigeradas ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até a realização das análises. Para as análises hematológicas, o sangue foi refrigerado em  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo as análises realizadas imediatamente após a coleta de sangue.

### **Análises plasmáticas**

O kit cortisol S (BioMérieux, França) foi utilizado para a determinação de cortisol nas alíquotas de plasma no equipamento mini-VIDAS® da técnica ELFA (ensaio fluorescente ligado a enzima). Os valores de medição do kit VIDAS® cortisol S variaram de 2 a 650  $\text{ng mL}^{-1}$ . O limite de detecção analítica foi de 2  $\text{ng mL}^{-1}$ . A repetibilidade, a reprodutibilidade entre séries e a reprodutibilidade entre lotes foram calculadas utilizando as recomendações do documento EP5-A2 do NCCLS. Os valores observados de precisão total, dependentes da concentração sérica, variaram de 7,42 a 12,98 coeficiente de variação (%). O coeficiente de variação para os peixes variou de 8,68% a 13,59% (TEIXEIRA et al., 2017). Os níveis de glicose plasmática foram determinados pelo

método enzimático a partir da glicose oxidase/glicose peroxidase. Este método é colorimétrico utilizando equipamento BT 3000 totalmente automatizado (500 testes h<sup>-1</sup>; Wiener lab®, Rosario, Argentina) (TEIXEIRA et al., 2017).

Aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, ureia, albumina e ácido úrico, foram utilizados kits Labtest®, detalhado a seguir. A atividade de AST no plasma foi determinada de acordo com Tietz (1986). Os níveis de proteínas totais no plasma foram determinados pela metodologia colorimétrica (biureto) (DOUMAS et al. 1981). Os níveis plasmáticos de ureia foram determinados pelo método enzimático cinético enzimático com urease (ROCH-RAMEL, 1967). Os níveis de albumina no plasma foram determinados utilizando o método colorimétrico (verde de bromocresol) (DOUMAS et al., 1971). Os níveis de ácido úrico no plasma foram determinados utilizando método colorimétrico (enzimático trinder) (HENRY et al. 1957).

### **Análises hematológicas**

Os eritrócitos foram quantificados em câmara de Neubauer ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ ) com auxílio de um microscópio óptico binocular após diluição de 0,01 mL de sangue em 4,0 mL de solução de Natt e Herrick.

A contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos, foi realizada por método indireto (HRUBEC e SMITH, 1998). Para isso, foram confeccionadas extensões sanguíneas que foram coradas por May-Grunwald-Giemsa. Em seguida, de cada extensão, quantificou-se 2.000 células, entre eritrócitos, leucócitos e trombócitos, e considerando o número de eritrócitos contados na câmara de Neubauer, calculou-se o número total de leucócitos e de trombócitos (HRUBEC e SMITH, 1998).

### **Análise estatística**

Todos os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM. Todos os dados foram submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A avaliação da atividade anestésica foi realizada por análise de regressão de potência (concentração  $\times$  tempo de sedação ou tempo de anestesia ou tempo de recuperação anestésica) (VIDAL et al., 2008). As variáveis bioquímicas e hematológicas foram analisadas por meio de ANOVA de dois fatores (tempo  $\times$  concentração anestésica), seguida por testes post hoc de Tukey com nível mínimo de significância de 95% ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

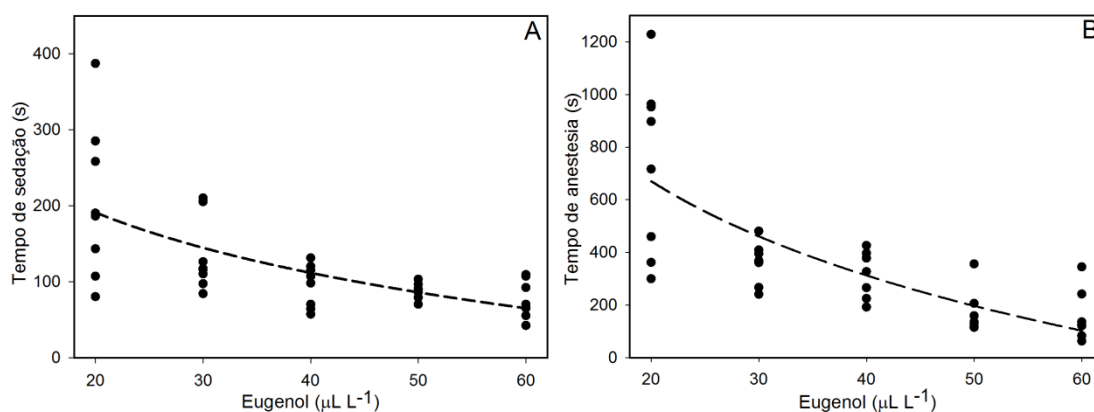
### Indução e recuperação anestésica

Juvenis dos grupos controle (somente água ou  $540 \mu\text{L L}^{-1}$  de etanol) ou expostos a  $10 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol não apresentaram efeito sedativo ou anestésico durante o período avaliado. Acima desta concentração, o eugenol causou sedação e anestesia em pintado Amazônico, onde  $20 \mu\text{L L}^{-1}$  foi a concentração mínima efetiva capaz de causar sedação.

Os menores tempos de anestesia foram verificados nos exemplares submetidos a 50 e  $60 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol ( $84,12 \pm 4,2$  e  $80,87 \pm 9,3$ , respectivamente, para sedação;  $169,00 \pm 29,0$  e  $155,00 \pm 33,0$  s, respectivamente, para anestesia), onde  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  foi a mínima concentração efetiva capaz de causar anestesia. Os resultados da regressão mostraram que concentrações mais altas de eugenol resultaram em um tempo menor requerido para sedação e anestesia em peixes (Fig. 1).

Juvenis expostos ao eugenol se recuperaram completamente e não houve mortalidade durante o experimento ou após 72 h de sua realização. O tempo de recuperação anestésica variou de  $228,00 \pm 14,23$  a  $297,00 \pm 18,43$  s. Não houve correlação do tempo de recuperação anestésica em relação às concentrações testadas.

Figura 1 – Curva de tempo para sedação (A) e anestesia (B) com uso de eugenol em juvenis de pintado Amazônico ( $n = 8$ ). A:  $y = 2007,6x^{-0,812}$ ;  $R^2 = 0,468$ . B:  $y = 52050,0x^{-1,45}$ ;  $R^2 = 0,659$ .

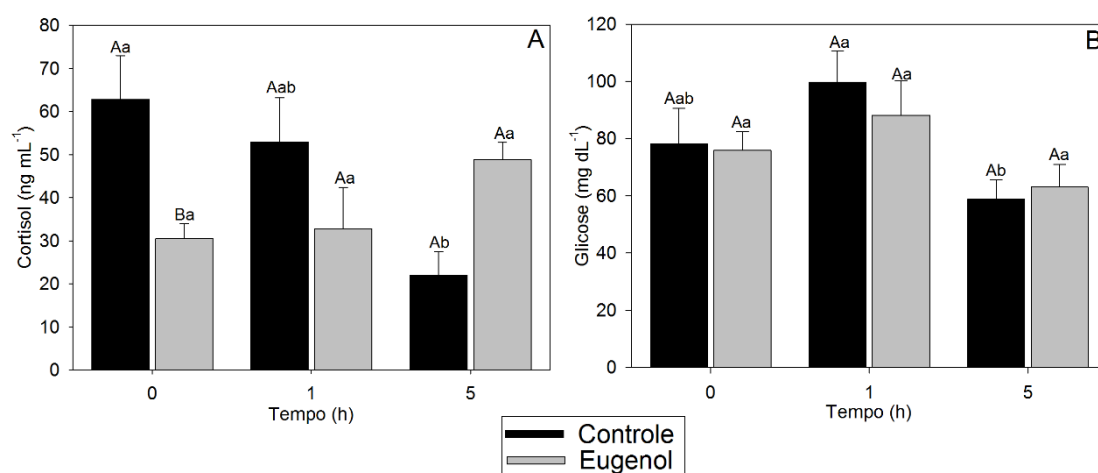


### Manejo – variáveis plasmáticas

No grupo anestesiado ( $50 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol), não ocorreu mortalidade. Contudo, no grupo não anestesiado foram registradas 25 e 50% de mortalidade dos juvenis nos tempos 0 e 1 h após o estresse de manejo. As mortes foram registradas de 30 a 180 min após a coleta de sangue.

No momento do estresse de manejo (0 h), os peixes anestesiados apresentaram níveis significativamente mais baixos de cortisol que os peixes controle ( $P < 0,05$ ). Além isto, no grupo controle os níveis de cortisol plasmático foram significativamente menores no tempo 5 h em comparação a 0 h após o manejo de estresse ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2A). Os níveis de glicose plasmática no grupo controle foram significativamente maiores no tempo 1 h em relação ao tempo 5 h após o estresse de manejo ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2B).

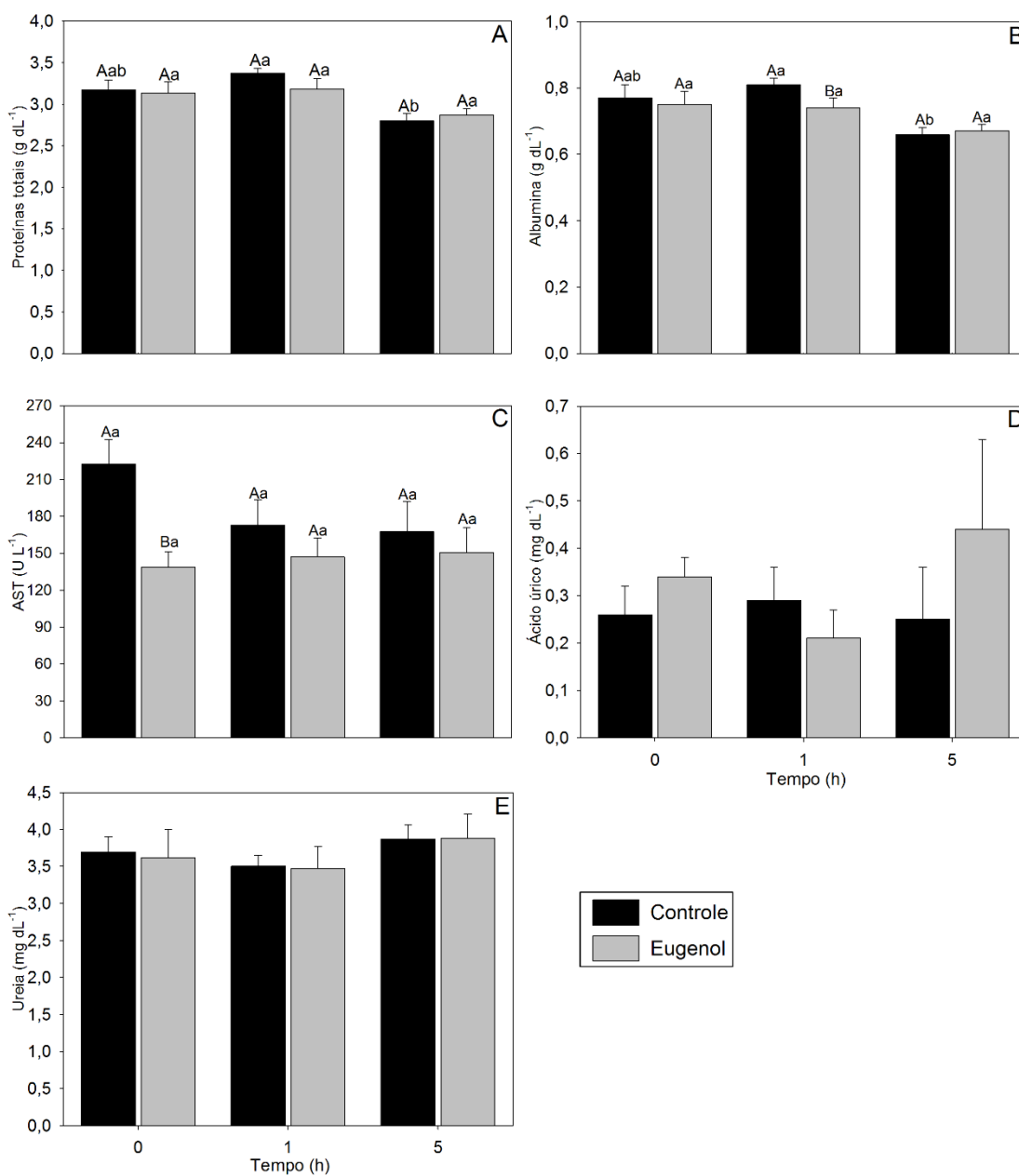
Figura 2 – Efeito do eugenol ( $50 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre cortisol (A) e glicose do plasma (B) em juvenis de pintado Amazônico após 0, 1 e 5 h de estresse de manejo (1 min). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tempos em um mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão (n = 8 peixes por tratamento em cada tempo).



Os níveis de proteínas totais do plasma no grupo controle foram significativamente maiores no tempo 1 h do que no tempo 5 h após o estresse de manejo ( $P < 0,05$ ) (Fig. 3A). 1 h após o estresse de manejo, os peixes anestesiados apresentaram níveis significativamente mais baixos de albumina que o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Além disto, em exemplares não anestesiados, os níveis plasmáticos de albumina foram significativamente menores em 5 h do que em 1 h após o estresse de manejo ( $P < 0,05$ ) (Fig. 3B). No momento do estresse de manejo, os exemplares anestesiados apresentaram

níveis significativamente mais baixos de AST no plasma que os peixes do grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Fig. 3C). Os níveis de ácido úrico e ureia plasmáticos foram semelhantes em todos os tratamentos em todos os tempos de avaliação (Fig. 3D e E).

Figura 3 – Efeito do eugenol ( $50 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre proteínas totais (A), albumina (B), AST (C), ácido úrico (D) e ureia (E) do plasma em juvenis de pintado amazônico após 0, 1 e 5 h de estresse de manejo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tempos em um mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n = 8$  peixes por tratamento em cada tempo).



### Manejo – variáveis hematológicas

Em 1 h após o estresse de manejo, os valores de trombócitos foram significativamente maiores em exemplares anestesiados do que no grupo controle ( $P < 0,05$ ). Os valores de neutrófilos em peixes anestesiados foram significativamente maiores em 5 h do que em 0 e 1 h após o estresse de manejo. Além disso, em peixes anestesiados, os valores de neutrófilos foram significativamente maiores do que peixes do grupo controle 5 h após o estresse de manejo ( $P < 0,05$ ). Os valores de eritrócitos, leucócitos totais, linfócitos e monócitos foram semelhantes em todos os tratamentos em todos os momentos ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do eugenol ( $50 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ ), trombócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ), leucócitos totais ( $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ), linfócitos ( $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ), neutrófilos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ) e monócitos ( $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ) em juvenis de pintado amazônico após 0, 1 e 5 h de estresse de manejo.

Variáveis	Tempo		
	0h	1h	5h
	Peixes não anestesiados		
Eritrócitos	$2,70 \pm 0,17^{\text{Aa}}$	$2,65 \pm 0,12^{\text{Aa}}$	$2,58 \pm 0,39^{\text{Aa}}$
Trombócitos Totais	$6,17 \pm 0,81^{\text{Aa}}$	$3,38 \pm 1,21^{\text{Ba}}$	$8,19 \pm 1,86^{\text{Aa}}$
Leucócitos Totais	$26,85 \pm 2,10^{\text{Aa}}$	$25,47 \pm 1,32^{\text{Aa}}$	$26,30 \pm 3,69^{\text{Aa}}$
Linfócitos	$23,97 \pm 2,57^{\text{Aa}}$	$23,41 \pm 1,41^{\text{Aa}}$	$23,34 \pm 3,20^{\text{Aa}}$
Neutrófilos	$5,89 \pm 1,68^{\text{Aa}}$	$4,83 \pm 1,33^{\text{Aa}}$	$22,55 \pm 4,43^{\text{Ba}}$
Monócitos	$22,64 \pm 13,02^{\text{Aa}}$	$10,79 \pm 4,27^{\text{Aa}}$	$9,02 \pm 1,58^{\text{Aa}}$
	Peixes anestesiados com eugenol		
Eritrócitos	$2,33 \pm 0,24^{\text{Aa}}$	$2,45 \pm 0,05^{\text{Aa}}$	$2,85 \pm 0,10^{\text{Aa}}$
Trombócitos Totais	$12,39 \pm 6,26^{\text{Aa}}$	$24,29 \pm 4,66^{\text{Aa}}$	$20,68 \pm 7,17^{\text{Aa}}$
Leucócitos Totais	$23,68 \pm 2,80^{\text{Aa}}$	$24,70 \pm 0,51^{\text{Aa}}$	$28,29 \pm 1,34^{\text{Aa}}$
Linfócitos	$21,61 \pm 2,54^{\text{Aa}}$	$21,47 \pm 0,41^{\text{Aa}}$	$20,46 \pm 3,72^{\text{Aa}}$
Neutrófilos	$5,10 \pm 1,34^{\text{Ab}}$	$15,38 \pm 2,73^{\text{Ab}}$	$54,07 \pm 8,65^{\text{Aa}}$
Monócitos	$12,11 \pm 3,38^{\text{Aa}}$	$19,91 \pm 4,36^{\text{Aa}}$	$37,38 \pm 19,65^{\text{Aa}}$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes tempos em um mesmo

tratamento ( $P < 0,05$ ). Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$  peixes por tratamento em cada tempo).

## DISCUSSÃO

O mecanismo de ação anestésica do eugenol em peixes ainda não foi elucidado. No entanto, Lee et al. (2015) descobriram que o eugenol age inibindo reversivelmente o complexo receptor do ácido gama-aminobutírico (GABAA) em neurônios de ratos e células renais embrionárias em humanos. A expressão do sistema GABAérgico parece ser conservada entre vertebrados, de peixes a mamíferos (DELGADO e SCHMACHTENBERG, 2008). No sistema nervoso central, o complexo receptor GABAA desempenha um papel na modulação de atividades fisiológicas e fisiopatológicas, e pode ser um alvo molecular para o eugenol, principalmente na modulação de respostas nociceptivas (LEE et al., 2015). Em outro estudo, Heldwein et al. (2012) demonstraram o envolvimento do sistema GABAérgico no efeito anestésico do óleo essencial de *Lippia alba* em bagres de prata. Assim, é possível que o eugenol também possa inibir o complexo receptor GABAA em pintado Amazônico, uma vez que a maioria dos anestésicos exerce seus efeitos regulando o complexo receptor GABAA, devido ao GABAA ser o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SIEGHART, 2006).

O conhecimento da dosagem anestésica ideal é essencial para a utilização apropriada de substâncias anestésicas, visto que dosagens inadequadas podem ser prejudiciais à saúde e até causar mortalidade em peixes (ROUBACH et al., 2001; LIMMA-NETTO et al., 2016).

A ausência de anestesia causada apenas pelo uso de etanol, como verificada em nosso estudo, tem sido relatada em estudos prévios para tilápia do Nilo (HOHLENWERGER et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2017), cavalo-marinho *Hippocampus reidi* (CUNHA et al., 2011) e bagre híbrido *Pseudoplatystoma metaense*  $\times$  *Leiarius marmoratus* (SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2014), demonstrando que o etanol em baixas concentrações é inexpressivo como anestésico em peixes.

Anestésicos em baixas concentrações possuem um efeito sedativo (LIMMA-NETTO et al., 2016). A sedação é um estado inicial de anestesia em que a percepção sensorial é reduzida, mas não há perda de equilíbrio (ROSS e ROSS, 2008). Neste sentido, nos sistemas de produção aquícola existem situações em que a sedação é desejável, e



preferível à anestesia, como no transporte de peixes, onde reduzir o estresse sem causar perda de resposta a estímulos é desejável (SENA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2017). Assim, considerando que a concentração usada para sedação em longo prazo deve ser a mínima possível para evitar anestesia profunda, neste estudo, 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol mostrou-se viável como sedativo para juvenis de pintado amazônico.

Similarmente, estudos prévios também verificaram que baixas concentrações de eugenol podem desempenhar efeito sedativo em peixes. Concentrações de até 5  $\mu\text{L L}^{-1}$  foram efetivas para sedação em matrinxã (*Brycon cephalus*) (INOUE et al., 2005) e em jundiá (*Rhamdia quelen*) (BECKER et al., 2012). A concentração ideal de sedativos é dependente de fatores como espécie, tempo de exposição, peso e estado de saúde animal e condições ambientais (IVERSEN et al., 2003). Isso pode explicar a maior concentração de eugenol necessária para sedação do pintado Amazônico do que para as espécies mencionadas anteriormente, demonstrando que o pintado Amazônico apresentar maior resistência de sedação com eugenol.

O estágio de anestesia, por sua vez, é necessário para realizar procedimentos de manipulação (por exemplo: reprodução, medicação e mudança de habitat). Um anestésico ideal deve induzir anestesia entre 1-3 minutos, com recuperação anestésica inferior a 5 minutos (MARKING e MEYER, 1985). Adicionalmente, deve-se considerar que o uso de doses menores implica em maior margem de segurança à saúde animal e, evitar desperdício de óleo essencial e gastos desnecessários (TEIXEIRA et al., 2017). Dessa forma, 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  é recomendada neste estudo como mínima concentração efetiva para anestesia de pintado Amazônico.

Tal resultado corrobora com a concentração de 50  $\text{mg L}^{-1}$  de eugenol recomendada para o manuseio de catifish híbrido (*Pseudoplatystoma metaense*  $\times$  *Leiarius marmoratus*) (SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2014), embora tal estudo não tenha avaliado o efeito do eugenol em variáveis bioquímicas e hematológicas. Adicionalmente, a concentração ótima estabelecida neste estudo também é a mesma descrita para bagre africano *Clarias gariepinus* (ÖGRET MEN e GÖKÇEK, 2013), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (VIDAL et al., 2006) e híbrido flowerhorn (*Amphilophus labiatus*  $\times$  *Amphilophus trimaculatus*) (TARKHANI, 2016). De acordo com nossos resultados, bem como resultados dos estudos prévios mencionados, 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol apresenta-se como uma concentração segura e efetiva para anestesia em diversas espécies de peixes.

Neste estudo, o uso de  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol foi eficaz para evitar a mortalidade em pintado Amazônico sob estresse, uma vez que não houve mortalidade em peixes anestesiados nessa concentração. Além disso, no grupo controle de peixes, mesmo 5 h após o estresse de manejo, não houve mortalidade. Isso demonstra a capacidade de ajuste desses peixes para o estresse de manejo com um maior tempo de recuperação (5 h), o que permitiria até mesmo a coleta de sangue. Este achado é apoiado pelos nossos resultados de cortisol plasmático, glicose, proteína total e níveis de albumina, que foram menores no grupo controle 5 h após o estresse de manejo.

Usualmente, após o manejo e biometria, os níveis plasmáticos de cortisol e de glicose em peixes tornam-se mais elevados. Tais efeitos são conhecidos como resposta ao estresse primário e secundário, respectivamente (BARCELLOS et al., 2001; ACERETE et al., 2004). Neste estudo, o eugenol mostrou-se eficiente como mitigador da resposta ao estresse, reduzindo os níveis plasmáticos de cortisol imediatamente após o manejo. Resultados similares foram demonstrados em jundiá (CUNHA et al., 2010) e tilápia do Nilo (SIMÕES et al., 2012), onde os níveis de cortisol plasmático foram reduzidos em peixes anestesiados com eugenol.

A resposta ao estresse é iniciada segundos após a presença do agente estressor. No hipotálamo, há a ativação da divisão sináptica do sistema nervoso autônomo simpático, seguido da liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (BALDISSETTO et al., 2014). O cortisol responde mais lentamente. A liberação de cortisol, assim como de catecolaminas, na corrente sanguínea, desencadeia processos metabólicos para que ocorra produção extra de energia, com o intuito conceder aos peixes adaptação às condições adversas (IWAMA et al., 2004).

O cortisol ativa o processo de gluconeogênese e glicogenólise, mobilizando e elevando a produção de glicose plasmática para lidar com o aumento da demanda energética (IWAMA et al. 1999). Adicionalmente, as variações nos níveis de glicose do plasma fornecem respostas ao estado de estresse de peixes (BRANDÃO et al., 2004). Neste estudo, elevação do nível de glicose plasmático em exemplares não anestesiados em 1 h após o manejo pode ser uma resposta fisiológica de adaptação frente a agentes estressantes, devido as catecolaminas e a gluconeogênese mediada por cortisol (PANKHURST, 2011), uma vez que tais níveis foram reestabelecidos 5 h após o estresse de manejo.

Além da glicose, as proteínas totais também estão relacionadas com a demanda energética dos peixes (JAVED e USMANI, 2015). Notavelmente, em nosso estudo, os resultados para os níveis de proteína plasmática total se assemelharam aos resultados dos níveis de glicose plasmática. É provável que este aumento nos níveis de proteína total no plasma em peixes não anestesiados seja indicador de mobilização de proteínas como substrato para glicogenólise hepática (BARCELLOS et al., 2003). Essa resposta também pode estar relacionada com a elevação de cortisol plasmático no momento no estresse de manejo (0 h) em peixes do grupo controle, uma vez que o cortisol está envolvido na regulação do metabolismo hepático de peixes (VIJAYAN et al., 1994). Neste sentido, a elevação dos níveis de albumina plasmática nos peixes não anestesiados pode ser atribuída ao maior metabolismo hepático (JAVED e USMANI, 2015), pois a albumina pode ser usada como fonte adicional de energia para lidar com distúrbios fisiológicos resultantes do estresse.

Outra variável importante para avaliação do bem-estar dos peixes é a atividade da AST do plasma. Pois o aumento da atividade desta enzima pode estar relacionado a hepatotoxicidade e danos hepáticos (EL-SAYED et al., 2007). Assim em nossos estudos, o uso de eugenol preveniu a elevação de AST do plasma nos juvenis anestesiados, contribuindo assim tanto para a manutenção do estado fisiológico, quanto para evitar hiperatividade e possíveis danos hepáticos. Finalmente, a mobilização de proteínas induzida pelo estresse pode causar aumento na quantidade de amônia excretada pelos peixes, e conseqüentemente elevação nas concentrações plasmáticas de ácido úrico e ureia (BARCELLOS et al., 2003). No entanto, isso não foi verificado no presente estudo.

Análises hematológicas em peixes, por sua vez, também são ferramentas usada corriqueiramente para avaliar alterações nas funções fisiológicas e, conseqüentemente, no estado de saúde (ESLAMLOO et al., 2013). Como constituintes do sistema imunológico animal, as células leucocitárias fazem parte do sistema imune não específico e estruturam a primeira linha de defesa contra patógenos (TAVARES-DIAS et al., 2009). Particularmente, os neutrófilos, têm ação de defesa celular oriunda de sua capacidade de realizar fagocitose.

O aumento do número de neutrófilos na corrente sanguínea de peixes confere maior eficiência da linha de defesa (SADO et al., 2014). Assim, a neutrofilia observada neste estudo em peixes anestesiados 5 h após o estresse de manejo, demonstra que o eugenol possivelmente promoveu aumento da resposta imune não específica em pintado Amazônico. Tal resultado corrobora com os encontrados para truta-arco-íris

(*Oncorhynchus mykiss*), o qual demonstrou que o eugenol induziu a neutrofilia (KANANI et al., 2011). No entanto, na dourada (*Sparus aurata*) a capacidade fagocitária não foi afetada pela exposição ao óleo de cravo (BAHI et al., 2018).

Os trombócitos podem representar uma conexão entre o sistema imunológico inato e adaptativo de peixes (PASSANTINO et al., 2005). Contudo, há controvérsia quanto ao seu papel de defesa (KÖLLNER et al., 2004), mas existem evidências que demonstram que podem envolver grande potencial para fagocitose (TAVARES-DIAS, 2007). Adicionalmente, os trombócitos são células que exercem função de coagulação sanguínea, no processo conhecido como hemostasia, sendo habitualmente encontrados em locais de inflamação (MATUSHIMA e MARIANO, 1996; PENHA et al., 1996). Neste estudo, o grupo de peixes não anestesiados apresentaram recuperação no valor de trombócitos após 5 h em relação a 1h após o estresse de manejo. Contudo, estes valores foram abaixo dos encontrados nos peixes anestesiados. Assim, a elevação do número de trombócitos em peixes anestesiados parece constituir um mecanismo de defesa para lidar com o distúrbio gerado pelo estresse.

Como visto, embora haja um efeito anestésico e redutor de estresse do eugenol em pintado Amazônico, para que o peixe restabeleça a homeostase, há um efeito compensatório do sistema imunológico, principalmente com alterações dos valores de trombócitos e neutrófilos.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados demonstraram que 20 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol são eficientes e adequados para sedação e anestesia, respectivamente, em juvenis de pintado Amazônico. O uso de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol foi eficaz para mitigar a resposta ao estresse imediatamente após o estresse de manejo, por reduzir a mortalidade, melhorar as respostas bioquímicas e reforçar o sistema imunológico. Esses resultados poderão ajudar nos procedimentos de manejo para reduzir os efeitos negativos sobre a saúde dos peixes em sistemas agrícolas intensivos, proporcionando maior bem-estar aos indivíduos e, conseqüentemente, melhor produtividade e benefícios econômicos em pisciculturas.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Laboratório de Nutrição e Comportamento de Organismos Aquáticos do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo apoio nesta atividade de pesquisa. O primeiro autor agradece a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ACERETE, L.; BALASH J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v. 237, p. 167–178, 2004.

BAHI, B.; GUARDIOLA, F.A.; ESTEBAN, M.A. A time course study of glucose levels and innate immune response in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) after exposure to clove oil-eugenol derived anaesthetic. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 77, p. 280–285, 2018.

BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. 2014. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. FUNEP; UNESP, Jacobicabal.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1465–1469, 2003.

BARCELLOS, L.J.G.; WOEHL, V.M.; WASSERMANN, G.F.; QUEVEDO, R.M.; ITTZE´S, I.; KRIEGER, M.H. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard), a South American Catfish. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 123–125, 2001.

BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; HELDWEIN, C.G.; ZEPPENFELD, C.C.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia*

*quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 789–796, 2012.

BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; RORATO, R.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H. Benzocaine and eugenol as anesthetics for golden fish (*Carassius auratus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1597–1602, 2012.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; ARAÚJO, L.D. Stocking density of tambaqui juveniles during second growth phase in cages. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 357–362, 2004.

CUNHA, M.A.; ZEPPENFELD, C.C.; GARCIA, L.O.; LORO, V.L.; FONSECA, M.B.; EMANUELLI, T.; VEECK, A.P.L.; COPATTI, C.E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2107–2114, 2010.

CUNHA, M.A.; SILVA, B.F.; DELUNARDO, F.A.C.; BENOVI, S.C.; GOMES, L.C.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, p. 683–688, 2011.

DELGADO, L.; SCHMACHTENBERG, O. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABAA $\alpha$ 1 and GABAB1 in the zebrafish cerebellum. **Cerebellum**, v. 7, p. 444–450, 2008.

DIEMER, O.; NEU, D.H.; BITTENCOURT, F.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W.R.; Feiden, A. Eugenol as anesthetic for silver catfish (*Rhamdia voulezi*) with different weight. **Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1495–1500, 2012.

DOUMAS, B.T.; BAYSE, D.D.; CARTER, R.J.; PETERS, T.; SCHAFFER, R. Candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. **Clinical chemistry**, v. 10, p. 42–50, 1981.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v. 31, p. 87–96, 1971.

EL-SAYED, Y.S.; SAAD, T.T.; EL-BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 212–217, 2007.

ESLAMLOO, K.; AKHAVAN, S.R.; ESLAMIFAR, A.; HENRY, M. Effects of background colour on growth performance, skin pigmentation, physiological condition and innate immune responses of goldfish, *Carassius auratus*. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 202–215, 2013.

HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F.M.C.; BÜRGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C.A.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMANN, B.M. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 436–443, 2012.

HENRY, R.J.; SOBEL, C.; KIM, J. A modified carbonate-phosphotungstate method for the determination of uric acid and comparison with the spectrophotometric uricase method. **American Journal of Clinical Pathology**, p. 28, v. 152–160, 1957.

HOHLENWERGER, J.C.; COPATTI, C.E.; SENA, A.C.; COUTO, R.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; SCHIMDT, D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 49, p. 119–126, 2016.

HOSSAIN, M.S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; SONY, N.M.; USAMI, M.; ONO, S.; FUJIEDA, M. Inosine supplementation effectively provokes the growth, immune response, oxidative stress resistance and intestinal morphology of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 952–963, 2016.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fishes. In: HRUBEC, T.C.; SMITH, S. (Eds.). A hematology of fishes. Schalm'S Veterinary Hematology. Blacksburg: Wiley-Blackwell, p. 1120–1125, 1998.

INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazônica**, v. 35, p. 289–295, 2005.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R.S.; ELIASSEN, R.A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S<sup>TM</sup> and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549 – 566, 2003.

IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, N. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15–19, 2004.

IWAMA, G.K.; VIJAYAN, M.M.; FORSYTH, R.B.; ACKERMAN, P.A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, p. 39, v. 901–909, 1999.

JAVED, M.; USMANI, N. Stress response of biomolecules (carbohydrate, protein and lipid profiles) in fish *Channa punctatus* inhabiting river polluted by Thermal Power Plant effluent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 237–242, 2015.

KANANI, H.G.; MIRZARGAR, S.S.; SOLTANI, M.; AHMADI, M.; ABRISHAMIFAR, A.; BAHONAR, A.; YOUSEFI, P. Anesthetic effect of tricaine methanesulfonate, clove oil and electroanesthesia on lysozyme activity of *Oncorhynchus mykiss*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, p. 393-402, 2011.

KÖLLNER, B.; FISCHER, U.; ROMBOUT, J.H.W.M.; TAVERNE-THIELE, J.J.; HANSEN, J.D. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of



monoclonal antibodies and RT-PCR. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, p. 1049–1062, 2004.

LEE, S.H.; MOON, J.Y.; JUNG, S.J.; KANG, J.G.; CHOI, S.P.; JANG, J.H. Eugenol inhibits the GABAA current in trigeminal ganglion neurons. **PLoS One**, v.10, p. e0117316, 2015.

LIMMA-NETTO, J.D.; SENA, A.C.; COPATTI, C.E. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, p. 727–733, 2016.

MARICCHIOLO, G.; GENOVESE L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **The Open Marine Biology Journal**, v. 5, p. 24–33, 2011.

MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2–5, 1985.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal Veterinary and Animal Science**, 33, 5–10, 1996.

MAZZAFERA, P. Allelopathic effects of the alcoholic extract of clove and eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 231–238, 2003.

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

ÖGRET MEN, F.; GÖKÇEK, K. Comparative efficacy of three anesthetic agents on juvenile african catfish, *clarias gariepinus* (burchell, 1822). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 13, p. 51–56, 2013.

PANKHURST, N.W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, p. 265–275, 2011.

PASSANTINO, L.; CIANCIOTTA, A.; PATRUNO, R.; RIBAUD, M.R.; JIRILLO, E.; PASSANTINO, G.F. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 27, p. 345–356, 2005.

PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana Caresbeiana*) thrombocytes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 33, p.15–18, 1996.

PRIETO-GUEVARA, M.J.; SILVA, R.F.; COSTA, L.S.; PEREIRA, R.T.; ROSA, P.V.R. Effect of fixed feeding time on growth, body composition, and hepatic histology of hybrid catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) fed with carbohydrates and lipids ratios. **Revevista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 28, p. 83–92, 2015.

RANZINI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem, Maringá.

ROCH-RAMEL, F. An enzymic and fluorophotometric method for estimating urea concentrations in nanoliter specimens. **Analytical biochemistry**, v. 21, p. 372–381, 1967.

ROSS, L.G.; ROSS, B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3rd ed. Blackwell Publishing, Oxford.

ROTILI, D.A.; DEVENS, M.A.; DIEMER, O.; LORENZ, E.K.; LAZZARI, R.; BOSCOLO, W.R. Eugenol as anesthetic for *Piaractus mesopotamicus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, p. 288–294, 2012.

ROUBACH R.; GOMES L.C.; VAL A.L. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS-222) to induce anesthesia in juveniles matrinx, *Brycon cephalus*. **Acta Amazônica**, v. 31, p. 159–163, 2001.

SADO, R.Y.; BICUDO, Á.J.A.; CYRINO, J.E.P. Hematology of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed graded levels of mannan 70 oligosaccharides (MOS). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 30–39, 2014.

SENA, A.C.; TEIXEIRA, R.R.; FERREIRA, E.L.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COUTO, R. D.; COPATTI, C. E. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus*×*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374–379, 2016.

SIEGHART, W. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. **Advances in Pharmacology**, v. 54, p. 231–263, 2006.

SILVA-SOUZA, J.G.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; FARIAS, W.M.; VALÉRIO JÚNIOR, J.F.; MENDONÇA, P.P. Eugenol as anesthetic for oscar, *Astronotus ocellatus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, p. 205–210, 2015.

SIMÕES, L.N.; GOMIDE, A.T.M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; GOMES, L.C. The use of clove oil as an anesthetic for advanced juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 34, p. 175–181, 2012.

SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p. 177–185, 2003.

SUÁREZ-MARTÍNEZ, R.O.; BERNAL-BUITRAGO, G.F.; VELASCO-GARZÓN, J.S.; PINZÓN-DAZA, M. A.; ESLAVA-MOCHA, P.R.; BALDISSEROTTO. B. Eugenol as an anesthetic for handling Hybrid *Pseudoplatystoma metaense* by *Leiarius marmoratus*. **Orinoquia Suplemento**, v. 18, p. 256–259, 2014.

TARKHANI, R.; IMANI, A.; JAMALI, H.; MOGHANLOU, K.S. Anaesthetic efficacy of eugenol on flowerhorn (*Amphilophus labiatus* x *Amphilophus trimaculatus*). **Aquaculture Research**, v. 48, p. 3207–32151, 2016.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B.; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S., 2009. Tool to monitor the health status of fish in cultivation, in: SARAN-NETO, A.; MARIANO W.S.; SÓRIA, S.F.P. (Eds.), *Special Topics in Health and Animal Breeding*. Pedro & João Publishers, São Carlos, pp. 43-80.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, p. 709–712, 2007.

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 3383–3392, 2017.

TIETZ, N.W. 1986. *Text Book of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders, Philadelphia.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.A.; SANTOS, G.B. Eugenol as an anesthetic for Nile tilapia. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, p. 1069–1074, 2008.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; MECÊDO, G.R. The use of eugenol as an anaesthetic for the handling of Pintado juveniles (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, p. 275–279, 2006.

VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON T.W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: study using the steroid analogue RU486. **General and Comparative Endocrinology**, v. 96, p. 75–84, 1994.

## CAPÍTULO 2

---

**Transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com uso de eugenol**

## **Transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com uso de eugenol**

### **RESUMO**

O estudo objetivou avaliar o tempo de indução e recuperação anestésica em juvenis de acará-bandeira expostos a diferentes concentrações de eugenol e, verificar a sua efetividade no transporte através de variáveis bioquímicas (glicose e glicogênio) e de qualidade de água. Juvenis foram transferidos para aquários contendo diferentes concentrações de eugenol: 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os peixes foram divididos em dois grupos: sedados com 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol e não sedados e, avaliados em 4 e 7 h após o transporte. A mínima concentração efetiva para sedação e anestesia ocorreu com 15 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol, respectivamente. Os níveis de oxigênio dissolvido na água foram significativamente maiores em 4 h do que 7 h após o transporte em exemplares sedados ( $P < 0,05$ ). Os níveis de amônia total na água foram significativamente maiores no grupo controle do que em exemplares sedados em 7 h após o transporte ( $P < 0,05$ ). Os níveis de glicose sanguínea em peixes sedados foram significativamente maiores em relação ao grupo controle em 7 h após o transporte ( $P < 0,05$ ). Conclui-se que 15 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol foram eficazes na sedação e anestesia de juvenis e, 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol tem potencial para ser usado no transporte de acará-bandeira por até 7 h água.

**Palavras-chave:** amônia, anestesia, glicogênio, glicose, sedação

**Eugenol in the transport of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*)****ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the effectiveness of eugenol for induction and anaesthesia recovery in freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*) juveniles and to verify its effectiveness in transport by biochemical variables (glucose and glycogen) and water quality variables. Juveniles were exposed to different concentrations of eugenol: 0 (control), 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Posteriorly, other fish were divided into two groups: sedated with 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  eugenol and non-sedated and they were evaluated at 4 and 7 h after transport. The minimum effective concentration for sedation and anaesthesia occurred with the use of 15 and 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  of eugenol, respectively. After transport, the dissolved oxygen was significantly higher at 4 than 7 h in sedated juveniles ( $P < 0.05$ ). The total ammonia was significantly higher in the control group than in the sedated group 7 h after transport ( $P < 0.05$ ). Blood glucose levels in the sedated fish were significantly higher in relation to the control group 7 h after transport ( $P < 0.05$ ). It is concluded that 15 and 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  of eugenol were effective in sedation and anaesthesia in juveniles, and 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  of eugenol has potential to be used up to 7 h transport of freshwater angelfish.

**Key words:** ammonia, anaesthesia, glucose, glycogen, sedation

## INTRODUÇÃO

O acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) está entre as espécies de peixes ornamentais mais conhecidas mundialmente (MITJANA et al., 2014), destacando-se principalmente por sua diversidade morfológica e padrões de coloração. Contudo, a espécie é sensível a procedimentos de manejo e transporte, bem como a condições de má qualidade de água, o que pode comprometer sua sobrevivência e desenvolvimento (NOROUZITALLAB et al., 2009).

A anestesia é uma prática estratégica na aquicultura, inclusive em espécies ornamentais, para realização de procedimentos de manipulação (reprodução, medicação e mudança de habitat) (PALIĆ et al., 2006). A utilização de anestésicos durante a manipulação pode reduzir a ativação do eixo hipotalâmico hipofisário-intrarrenal (THOMAS e ROBERTSON, 1991) e, conseqüentemente, reduzir o estresse e injúrias físicas decorrente da manipulação (PALIĆ et al., 2006; SIMÕES e GOMES, 2009), melhorando assim o bem-estar de peixes.

Em adição, compostos anestésicos em baixas concentrações podem ser usados para sedar peixes durante o transporte. Dessa forma, os peixes poderiam suportar transportes por períodos mais longos. Isto se aplica, por exemplo, ao transporte de peixes ornamentais, cujo transporte, muitas vezes, ocorre por longas distâncias a partir de centros de produção (LIM et al., 2003) ou de locais de captura no ambiente natural.

O eugenol é o principal composto químico do óleo de cravo, usualmente empregado na aquicultura para sedação e anestesia de peixes (SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2014). Além disso, estudos prévios têm demonstrado a eficiência sedativa e anestésica de eugenol em diferentes espécies de peixes ornamentais, como peixe-zebra (*Danio rerio*) (GRUSH et al., 2004), quinguio (*Carassius auratus*) (BITTENCOURT et al., 2012), betta (*Betta splendens*) (FABREGAT et al., 2015), oscar (*Astronotus ocellatus*) (SILVA-SOUZA et al., 2015) e flowerhorn (*Amphilophus labiatus* x *Amphilophus trimaculatus*) (TARKHANI et al., 2016).

Em acará-bandeira, eugenol também já se demonstrou eficaz como sedativo e anestésico (HEKIMOĞLU e ERGUN, 2012; MITJANA et al., 2014; TARKHANI et al., 2017), mas não temos conhecimento de nenhum estudo que tenha avaliado qualidade da água e variáveis metabólicas em situações de transporte da espécie. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o tempo de indução e recuperação anestésica em juvenis de



acará-bandeira expostos a diferentes concentrações de eugenol na água e, verificar a sua efetividade no transporte através de variáveis bioquímicas e de qualidade de água.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e condições experimentais**

Os procedimentos experimentais ocorreram no Laboratório do Estudo e Fisiologia da Fauna Aquática do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (IBIO-UFBA), Salvador – BA, Brasil. Foram utilizados juvenis de acará-bandeira da linhagem negro véu, adquiridos de produtores de peixes ornamentais locais. Previamente aos testes, os peixes foram mantidos por sete dias em taques com aeração constante, onde passaram por um período de aclimação. O arraçoamento foi suspenso 24 h antes dos ensaios experimentais. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do IBIO-UFBA (número 41-2017).

### **Indução e recuperação anestésica**

Para determinar a influência da concentração de eugenol na indução e recuperação anestésica foram utilizados 56 juvenis de acará-bandeira ( $0,80 \pm 0,08$  g e  $3,6 \pm 0,10$  cm;  $n = 8$  para cada concentração testada). Os exemplares foram transferidos para aquários contendo 2 L de água e eugenol (Biodinâmica, Ibiporã-PR, Brasil) em concentrações de 10, 15, 20, 30, 40, 50 e  $60 \mu\text{L L}^{-1}$ . As concentrações foram diluídas em etanol (1:10). No tratamento controle os peixes foram transferidos para aquários com apenas água e etanol em uma concentração equivalente à diluição utilizada para  $60 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol ( $540 \mu\text{L L}^{-1}$  de etanol). Também foi realizado um controle contendo somente água.

Para avaliação do tempo necessário para a indução anestésica, em cada aquário foram colocados dois peixes ao mesmo tempo. O período de avaliação foi de até 30 minutos e cada peixe foi usado apenas uma vez (adaptado de SENA et al., 2016). Foi avaliada a menor concentração anestésica capaz de causar anestesia entre 1-3 minutos, com recuperação anestésica inferior a 5 minutos (MARKING e MEYER, 1985).

Para indução anestésica foram avaliados sedação (perda parcial de equilíbrio com redução de resposta a estímulos) e anestesia (perda total de equilíbrio e ausência de resposta a estímulos) (adaptado de SMALL et al., 2003). Para verificação do tempo de recuperação anestésica, os exemplares foram transferidos para aquários com 2 L de água (sem eugenol). Os peixes foram considerados recuperados quando responderam a

estímulos externos e apresentaram natação similar aos exemplares do grupo controle (adaptado de SENA et al., 2016). A sobrevivência foi monitorada até 72 h após a indução anestésica.

### **Transporte**

Exemplares de acará-bandeira ( $1,75 \pm 0,17$  g e  $4,49 \pm 0,12$  cm;  $n = 40$ ) foram divididos em dois grupos: sedados com eugenol (16 peixes) e não sedados (grupo controle) (16 peixes). Os peixes foram colocados aleatoriamente em sacolas plásticas contendo 0,5 L de água (dois peixes por sacolas;  $n = 8$  para cada tempo de avaliação) com oxigênio inflado. O grupo de peixes sedados foi exposto a  $15 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol (ver resultados de “indução e recuperação anestésica”). As sacolas plásticas foram acondicionadas em caixas plásticas, sendo transportadas por carro. Foram realizadas avaliações nos tempos de 4 e 7 h.

Nos tempos de 0, 4 e 7 h, as variáveis de qualidade de água ( $n = 3$  para cada tempo de avaliação) foram monitoradas para temperatura e oxigênio dissolvido com oxímetro (DO-48), pH com pHmetro (mPA-210P) e, concentrações de amônia total, alcalinidade, dióxido de carbono e nitrito com kit comercial (Alfatecnoquímica, Florianópolis, SC, Brasil). A amônia não ionizada foi calculada de acordo com uma tabela de conversão para peixes de água doce.

### **Variáveis bioquímicas**

Inicialmente, realizaram-se medidas biométricas (peso e comprimento total) de oito exemplares no tempo 0 h. Em seguida, procedeu-se as coletas de sangue e músculo. O sangue foi coletado por meio de punção venocaudal utilizando seringa estéril para determinação de glicose sanguínea ( $n = 6$  para cada tempo de avaliação em cada tratamento). A glicemia foi determinada pelo uso de tiras de microfilme e um medidor portátil (Accu-Chek; Mannheim, Alemanha). Em seguida, os peixes foram anestesiados com benzocaína (1 g/10 L) e eutanasiados para coleta de tecido muscular ( $n = 6$  para cada tempo de avaliação em cada tratamento). Os 32 peixes restantes foram submetidos aos mesmos procedimentos após o transporte (4 ou 7 h).

O tecido muscular foi mantido em freezer ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e, posteriormente, foi realizada a determinação a concentração de glicogênio muscular de acordo com Bidinotto et al. (1997). Para isto, foram pesadas amostras de 50 a 100 mg de músculo, colocadas em tubos de ensaio para homogeneização. Foram adicionados 1,0 ml de hidróxido de potássio 6,0

N e incubado por 3 minutos em banho-maria a 100 °C. Posteriormente a dissolução, 100 µL deste extrato foi transferido para um tubo e adicionado 250 µL de etanol e 100 µL de sulfato de potássio 10 %, seguido de agitação. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado resuspendido em 2 mL de água destilada. Posteriormente, realizou-se a transferência de 100 µL da amostra, 250 µL de fenol e 1 mL de ácido sulfúrico para parar a reação, após foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 480 nm.

### **Análise estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A normalidade foi verificada por teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Levene. O efeito das dosagens de eugenol para indução e recuperação anestésica foi avaliado por meio de regressão potência (VIDAL et al., 2008). As variáveis bioquímicas e físico-químicas da água foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de dois fatores (concentração anestésica X tempo), seguido de teste post-hoc de Tukey com nível mínimo de significância de 95% ( $P < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

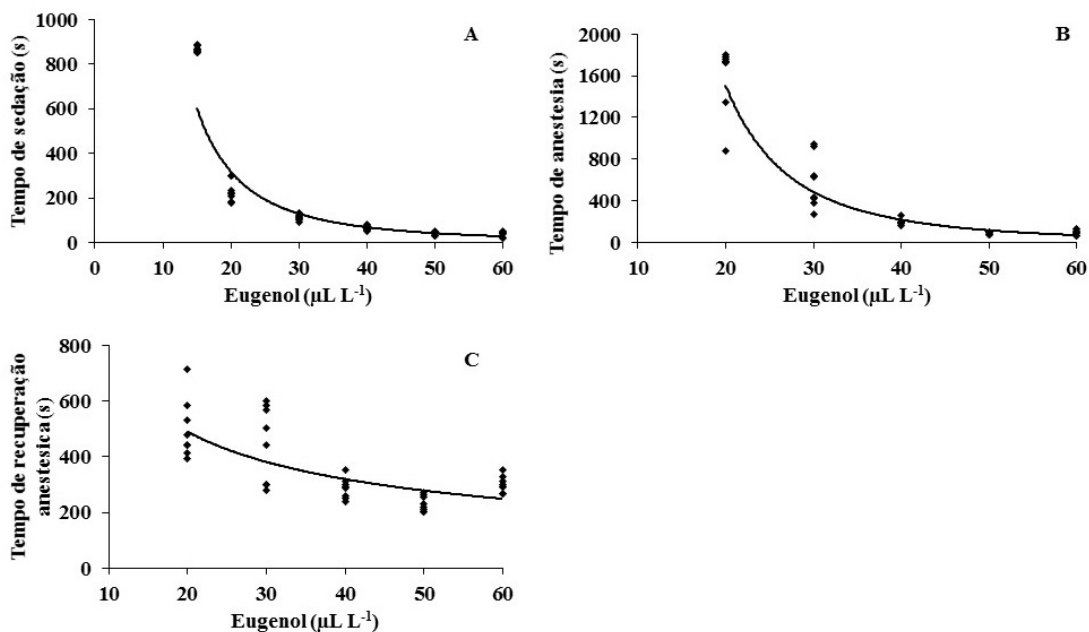
### **Indução e recuperação anestésica**

Juvenis de acará-bandeira expostos ao eugenol recuperam-se totalmente e não houve mortalidade durante o experimento ou 72 h após a sua realização. Os exemplares do grupo controle e expostos a 10 µL L<sup>-1</sup> de eugenol não apresentaram nenhum efeito anestésico durante o período avaliado. O grupo exposto a 15 µL L<sup>-1</sup> de eugenol apresentou apenas sedação. Acima destas concentrações, o eugenol causou sedação e anestesia em todos os peixes avaliados.

Os menores tempos de anestesia foram verificados nos exemplares submetidos a 50 e 60 µL L<sup>-1</sup> de eugenol ( $39,25 \pm 2,48$  e  $88,75 \pm 4,14$  e  $37,25 \pm 3,66$  e  $95,88 \pm 9,61$  segundos, respectivamente para sedação e anestesia), onde 50 µL L<sup>-1</sup> foi a mínima concentração efetiva capaz de causar anestesia. O menor tempo de recuperação pós-anestésica foi verificado nos exemplares submetidos a 50 µL L<sup>-1</sup> de eugenol ( $232,00 \pm 9,88$  segundos). As curvas de regressão obtidas em relação aos tempos de indução e recuperação anestésica foram lineares decrescentes, mostrando que a medida em que foi

umentada a concentração de eugenol, o tempo requerido para indução e recuperação anestésica foi reduzido (Fig. 1).

Figura 1 – Curva de tempo para sedação (A) e anestesia (B) e recuperação anestésica com uso de eugenol em juvenis de acará-bandeira (n = 8 peixes por tratamento). A:  $y = 245153x^{-2,22}$ ;  $R^2 = 0,929$ . B:  $y = 6525648,26x^{-2,79}$ ;  $R^2 = 0,92$ ; C:  $y = 30924x^{-0,615}$ ;  $R^2 = 0,522$ .



### Transporte - variáveis físico-químicas da água

Não houve mortalidade durante o experimento ou 72 h após a sua realização. A temperatura foi significativamente maior no tempo 7 h em relação ao tempo 4 h em ambos os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Os níveis de oxigênio dissolvido foram significativamente maiores no tempo 4 h em relação ao tempo 7 h em exemplares sedados ( $P < 0,05$ ). Os níveis de amônia total e amônia não ionizada foram significativamente maiores no grupo controle no tempo 7 h do que em exemplares sedados no mesmo tempo ( $P < 0,05$ ). A alcalinidade no grupo controle nos tempos 4 e 7 h foram significativamente maiores do que nos exemplares sedados nos mesmos tempos ( $P < 0,05$ ). As demais variáveis de qualidade de água não diferiram significativamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do eugenol nas variáveis de qualidade de água em juvenis de acará-bandeira após transporte (0, 4 e 7 h).

Variáveis	Antes do transporte			Eugenol (15 $\mu\text{L L}^{-1}$ )	
	0 h	4 h	7 h	4 h	7 h
pH	7,47	7,07 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>	7,07 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>	7,10 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>	6,97 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>
Temperatura (°C)	26,20	27,25 $\pm$ 0,05 <sup>Ab</sup>	28,43 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	27,3 $\pm$ 0,03 <sup>Ab</sup>	28,45 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	9,30	13,20 $\pm$ 0,36 <sup>Aa</sup>	10,93 $\pm$ 1,27 <sup>Aa</sup>	15,59 $\pm$ 0,86 <sup>Aa</sup>	11,19 $\pm$ 0,84 <sup>Ab</sup>
Amônia total (mg L <sup>-1</sup> N-NH <sub>3</sub> )	0,13	0,67 $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	1,08 $\pm$ 0,17 <sup>Aa</sup>	0,37 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	0,58 $\pm$ 0,08 <sup>Ba</sup>
Amônia não ionizada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ N-NH <sub>3</sub> )	2,21	4,90 $\pm$ 0,30 <sup>Aa</sup>	8,02 $\pm$ 0,58 <sup>Aa</sup>	3,04 $\pm$ 0,56 <sup>Aa</sup>	3,50 $\pm$ 0,57 <sup>Ba</sup>
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	30,00	48,33 $\pm$ 1,67 <sup>Aa</sup>	45,00 $\pm$ 2,89 <sup>Aa</sup>	33,33 $\pm$ 3,33 <sup>Ba</sup>	31,67 $\pm$ 1,67 <sup>Ba</sup>
Dióxido de carbono (mg de CO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	2,00	2,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	2,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	2,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	2,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> N-NO <sub>2</sub> )	0,01	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,08 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>

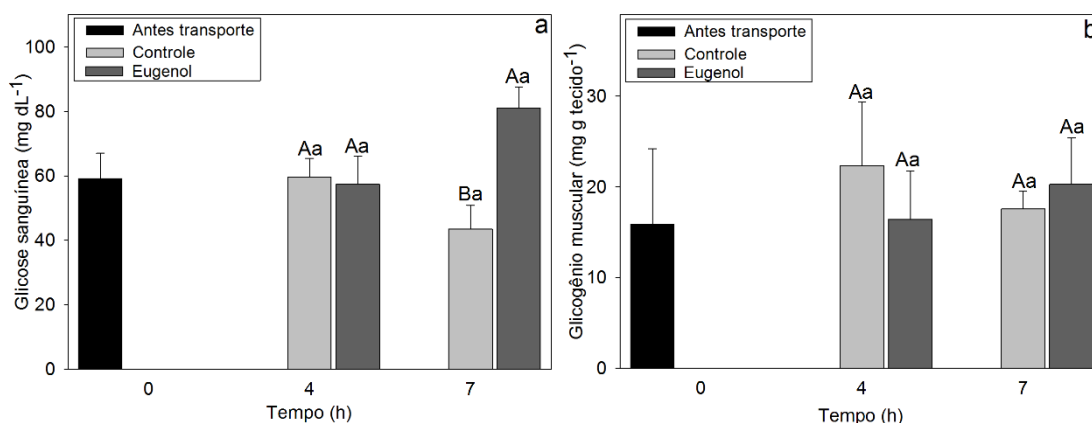
Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão (n = 3 sacolas plásticas por tratamento em cada tempo). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos em um mesmo tratamento (P < 0,05).

### Transporte - variáveis bioquímicas e histológicas

Os níveis de glicose sanguínea no grupo de exemplares sedados foram significativamente maiores em relação ao grupo controle no tempo 7 h (P < 0,05) (Fig.

2A). Os níveis de glicogênio muscular não diferiram entre os tratamentos ou em relação aos diferentes tempos de transporte (Fig. 2B).

Figura 2 – Efeito do eugenol ( $15 \mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre glicose sanguínea (A) e glicogênio muscular (B) em juvenis de acará-bandeira após transporte (0, 4 e 7 h).



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo ( $P < 0,05$ ). Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n = 6$  peixes por tratamento em cada tempo).

## DISCUSSÃO

No presente estudo,  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol demonstrou-se eficiente e seguro para indução anestésica em acará-bandeira, uma vez que concentrações mais baixas de eugenol ocasionaram maior tempo para indução e recuperação anestésica. O mecanismo de ação do eugenol na anestesia de peixes ainda não é satisfatoriamente conhecido. Contudo, análises *in vitro* demonstraram que eugenol pode atuar na percepção de respostas nociceptivas através de interação com neurotransmissores, exercendo efeito antagonista no sistema GABAérgico (AOSHIMA e HAMAMOTO, 1999). Assim, é provável que eugenol exerça função anestésica através de inibição de receptores GABAA em acará-bandeira.

Adicionalmente, eugenol em altas concentrações, não deve ser usado no transporte de peixes, pois pode causar anestesia profunda e, conseqüentemente, provocar efeitos nocivos ou causar mortalidade (HOSKONEN e PIRHONEN, 2004). Durante o transporte de peixes recomenda-se a utilização da mínima concentração sedativa capaz de reduzir a atividade, sem causar perda de equilíbrio dos peixes (SENA et al., 2016). Assim, no presente estudo,  $15 \mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol mostrou-se viável como sedativo para o transporte de juvenis de acará-bandeira.

Durante o transporte, a manutenção de variáveis de qualidade de água em níveis adequados é essencial para o bem-estar dos peixes (HARMON, 2009). Por exemplo, alterações no fluxo de água e insolação são fatores que tendem a aumentar a temperatura da água durante o transporte (SENA et al., 2016). Isto explica a maior temperatura da água registrada após 7 h de transporte no corrente estudo. Em termos gerais, o aumento da temperatura da água causa redução nas concentrações de oxigênio dissolvido (MATTHEWS e BERG, 1997), como verificado neste estudo após 7 h de transporte para exemplares sedados com eugenol. Em adição, no presente estudo, apesar das diferenças encontradas, temperatura e oxigênio dissolvido da água mantiveram-se dentro dos níveis indicados para acará-bandeira (RIBEIRO et al., 2010).

Outro resultado interessante foi que o uso de eugenol no transporte de acará-bandeira manteve os níveis de alcalinidade da água similar ao tempo 0 h. Já a elevação da alcalinidade da água verificada no grupo controle pode ter sido desencadeada por um maior fluxo de íons (TEIXEIRA et al., 2018), os quais se associaram a carbonatos e bicarbonatos presentes na água (BOYD et al., 1992). Por fim, os valores de amônia encontrados no grupo sem eugenol após 7 h de transporte apresentaram-se em níveis considerados tóxicos para acará-bandeira (SEREZLI et al., 2016). Assim, o eugenol reduziu a concentração de amônia na água e, conseqüentemente, contribuiu com o bem-estar dos peixes durante o transporte.

O procedimento de transporte comumente modifica a demanda energética (SENA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2018). A elevação nos níveis de glicose é uma resposta secundária comumente desencadeada por catecolaminas e cortisol, que conferem o fornecimento energético para os peixes lidarem com os distúrbios gerados por eventos estressantes (IWAMA et al., 2004). O aumento de glicemia encontrado no presente estudo apresenta-se como uma fonte de fornecimento energético para as demandas metabólicas, o que pode favorecer o uso de proteínas e glicogênio para outras funções vitais (BECKER et al., 2016). Em adição, a glicemia manteve-se dentro do intervalo considerado seguro para peixes (TAVARES-DIAS, 2015).

Outro aspecto a ser considerado é que sob condições estressantes, a elevação nos níveis de glicose sanguínea também pode indicar a utilização de reservas energéticas, como glicogênio muscular (COBAN e SEN, 2011). Isso foi verificado em jundiás transportados com óleo essencial de *Lippia alba* (30  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), onde foi verificado redução dos níveis de glicogênio muscular e hepático (BECKER et al., 2016). Contudo, é notável em nosso estudo que resultados para os níveis de glicogênio muscular se assemelharam

aos resultados dos níveis de glicose sanguínea. Uma vez que o aumento nos níveis de glicose sanguínea não foi decorrente da quebra de glicogênio muscular por glicogenólise (INOUE et al., 2005). Além disso, não foi possível avaliar glicogênio hepático devido a pouca massa de fígado típica dos exemplares da espécie que apresentam pequeno tamanho corporal.

Finalmente, deve-se considerar o revés relacionado ao pequeno tamanho dos exemplares, o qual inviabilizou a realização de análises plasmáticas. Assim, os achados do presente estudo poderiam ser melhor elucidados através da realização de outras análises que investiguem o efeito do eugenol no transporte de acará-bandeira, como, por exemplo, análises histopatológicas e de estresse oxidativo (cérebro e fígado).

## CONCLUSÃO

Conclui-se que 15 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol na água são eficientes para causar sedação e indução anestésica, respectivamente, em acará-bandeira. Em adição, 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol tem potencial para ser usado no transporte de acará-bandeira por até 7 h, pois reduziu os níveis de amônia na água e forneceu energia por elevação de glicemia dentro do intervalo de segurança para peixes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Prof. Dr. Alberto Oliveira Lima da União Metropolitana de Educação e Cultura – UNIME, pelo aporte concedido nesta atividade de pesquisa. O primeiro autor agradece a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 743–748, 1999.



BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; ZEPPENFELD, C.C.; SALBEGO, J.; CUNHA, M.A.; HELDWEIN, C.G.; LORO, V.L.; HEINZMANN, B.M.; BERNARDO BALDISSEROTTO, B. Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 42, p. 73–81, 2016.

BIDINOTTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53–60, 1997.

BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; RORATO, R.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H. Benzocaine and eugenol as anesthetics for golden fish (*Carassius auratus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1597–1602, 2012.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S.; SOMRIDHIVEJ, B. Alkalinity and hardness: critical but elusive concepts in aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, p. 6–41, 1992.

COBAN, M.Z.; SEN, D. Examination of liver and muscle glycogen and blood glucose levels of *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) living in Hazar Lake and Keban Dam Lake (Elazig, Turkey). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 10271–10279, 2011.

FABREGAT, T.E.H.P.; PEREIRA, M.M.; ASSAHINA, T.B.; BROGGI, J.A. The use of eugenol in bettas: a study of different concentrations and successive administrations. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, p. 365–371, 2015.

GRUSH, J.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebra fish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebra Fish**, v. 1, p. 46–53, 2004.

HARMON, T.S. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p. 58–66, 2009.

HEKIMOĞLU, M.A.; ERGUN, M. Evaluation of clove oil as anaesthetic agent in fresh water angelfish, *Pterophyllum scalare*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, p. 1297–1300, 2012.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. The effect of clove oil sedation on oxygen consumption of six temperate-zone fish species. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1002–1005, 2004.

INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazônica**, v. 35, p. 289–295, 2005.

IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, N. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15–19, 2004.

LIM, L.C.; DHERT, P.; SORGELOOS, P. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 923–935, 2003.

MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2–5, 1985.

MATTHEWS, K.R.; BERG, N.H. Rainbow trout responses to water temperature and dissolved oxygen stress in two southern California stream pools. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p. 50-67, 1997.

MITJANA, O.; BONASTRE, C.; INSUA, D.; FALCETO, M.V.; ESTEBAN, J.; JOSA, A.; ESPINOSA, E. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**, v. 433, p. 491–495, 2014.

NOROUZITALLAB, P.; FARHANGI, M.; BABAPOUR, M.; RAHIMI, R.; SINHA, A.K.; BARUAH, K. Comparing the efficacy of dietary  $\alpha$ -tocopherol with that of DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate, both either alone or in combination with ascorbic acid, on growth and

stress resistance of angelfish, *Pterophyllum scalare*, juveniles. **Aquaculture International**, v. 17, p. 207–216, 2009.

PALIĆ, D.; HEROLT, D.M.; ANDREASEN, C.B.; MENZEL, B.W.; ROTH J.A. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 820). **Aquaculture**, v. 254, p. 675–685, 2006.

RIBEIRO, F.A.S.; JORGE, P.H.; FERNANDES, J.B.K.; SAKOMURA, N.K. Stocking density to produce freshwater angelfish polycultured in ponds with amazon river prawn. **Revista Caatinga**, v. 23, p. 129–134, 2010.

SENA, A.C.; TEIXEIRA, R.R.; FERREIRA, E.L.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COUTO, R. D.; COPATTI, C. E. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus*×*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374–379, 2016.

SEREZLI, R.; KUCUKAGTAS, A.; KURTOGLU, I.Z. Acute toxicity of ammonia and nitrite to angel fish (*Pterophyllum scalare*, Liechtenstein 1823) and the effect of erythrocyte morphology. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, p. 3119–3124, 2016.

SILVA-SOUZA, J.G.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; FARIAS, W.M.; VALÉRIO JÚNIOR, J.F.; MENDONÇA, P.P., 2015. Eugenol as anesthetic for oscar, *Astronotus ocellatus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, p. 205–210, 2015.

SIMÕES, L.N.; GOMES, L.C. Menthol efficiency as anesthetic for juveniles Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, p. 613–620, 2009.

SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p. 177–185, 2003.

SUÁREZ-MARTÍNEZ, R.O.; BERNAL-BUITRAGO, G.F.; VELASCO-GARZÓN, J.S.; PINZÓN-DAZA, M.A.; ESLAVA-MOCHA, P.R.; BALDISSEROTTO, B. Eugenol as an anesthetic for handling Hybrid *Pseudoplatystoma metaense* by *Leiarius marmoratus*. **Orinoquia Suplemento**, v. 18, p. 256–259, 2014.

TARKHANI, R.; IMANI, A.; JAMALI, H.; FARSANI, H.G. Anaesthetic efficacy of eugenol on various size classes of angelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823). **Aquaculture research**, v. 48, p. 5263–5270, 2017.

TARKHANI, R.; IMANI, A.; JAMALI, H.; SARVI, M.K. Anesthetic efficacy of eugenol on flowerhorn (*Amphilophus labiatus* x *Amphilophus trimaculatus*). **Aquaculture Research**, v. 48, p. 3207–3215, 2016.

TAVARES-DIAS. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. & MARIANO, W.S. (Org.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Editora Pedro & João, 2015.

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in Nile tilapia transport. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, p. 17–24, 2018.

THOMAS, P.; ROBERTSON, L. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. **Aquaculture**, v. 96, p. 69–86, 1991.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALAMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1069–1074, 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A melhoria na eficiência de procedimentos de manejos e de transporte é de fundamental importância em sistemas de produção aquícolas intensivos, uma vez que procedimentos rotineiros podem causar efeitos negativos sobre a saúde dos peixes, afetar o bem-estar, a produtividade e, conseqüentemente, causar perdas econômicas. A fim de minimizar, evitar ou superar o problema, torna-se necessário maior disponibilidade de informações para que os produtores possam otimizar práticas de manejo e obter maior eficiência produtiva e maior rentabilidade.

A partir dos nossos resultados, é possível recomendar a utilização de eugenol como sedativo e anestésico para pintado Amazônico e acará-bandeira. Além disto, o eugenol pode ser indicado para realização de procedimentos de manejo em juvenis de pintado Amazônico por ter reduzido o estresse de manejo e, no transporte de acará-bandeira, por reduzir os níveis de amônia da água. O uso de eugenol poderia proporcionar assim, maior bem-estar e incremento a produtividade para estas espécies. Tornando-se assim, uma alternativa na redução das principais causas de estresse em sistemas de produção aquícolas intensivo.

Contudo, visando estudos futuros, recomenda-se que seja avaliado o efeito do eugenol em um maior espectro de aspectos fisiológicos, antioxidantes, histológicos e comportamentais em pintado Amazônico e acará-bandeira, bem como outras espécies de peixes de interesse aquícola. Assim, futuramente, a utilização de eugenol, bem como outros anestésicos alternativos poderá ser ampliada, o que demonstra a necessidade de acompanhamento de testes e regulamentação destes anestésicos.