



## O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Larissa Novaes Simões<sup>1</sup>, Andrea Tassis Mendonça Gomide<sup>1</sup>, Vera Maria Fonseca Almeida-Val<sup>2</sup>, Adalberto Luis Val<sup>2</sup> e Levy Carvalho Gomes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, Centro Universitário Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, 29102-770, Boa Vista, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Manaus, Amazonas, Brasil.  
\*Autor para correspondência: E-mail: levy.gomes@uvv.br

**RESUMO.** A inevitável manipulação de peixes vivos em piscicultura causa uma série de reações fisiológicas adversas, o que exige o uso de anestésicos. O objetivo foi avaliar a eficiência do óleo de cravo como anestésico para juvenis avançados (aproximadamente 55 g e 13 cm) de tilápia do Nilo durante o manejo. No primeiro experimento, os peixes foram expostos a banhos anestésicos em seis diferentes concentrações (80; 100; 150; 200; 250 e 300 mg L<sup>-1</sup>) e foi avaliado o tempo de indução aos diferentes estágios de anestesia. No segundo experimento, avaliaram-se os diferentes tempos de exposição à anestesia, sendo verificada a margem de segurança do anestésico. Por último, avaliaram-se as respostas de estresse após a anestesia em 250 mg L<sup>-1</sup>. Os parâmetros avaliados foram cortisol, glicose, hematócrito, hemoglobina e níveis plasmáticos de sódio e potássio. A concentração 250 mg L<sup>-1</sup> de óleo de cravo foi a mais adequada para indução de anestesia cirúrgica. Para a anestesia voltada para biometria e breve manejo, a concentração mais adequada foi 150 mg L<sup>-1</sup>. A exposição à concentração ideal de óleo de cravo por 10 min., não causou estresse severo, ocorrendo alterações após a anestesia somente nos níveis de glicose e hematócrito.

**Palavras-chave:** estresse, eugenol, manejo, sedação.

### The use of clove oil as an anesthetic for advanced juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

**ABSTRACT.** Handling of live fish is inevitable in fish farms and causes a number of adverse physiological reactions, thus requiring the use of anesthetics. The main goal of the present work was to evaluate the efficiency of clove oil as an anesthetic for juvenile tilapia (approximately 55 g and 13 cm) during handling. In the first experiment, fishes were exposed to an anesthetic bath at six concentrations (80, 100, 150, 200, 250 and 300 mg L<sup>-1</sup>). Subsequently, the induction time was assessed for different stages of anesthesia. In the second experiment, different times of exposure to anesthesia were tested, aiming to assess the safety margin of the anesthetic. Finally, we evaluated the responses to stress after exposure to 250 mg L<sup>-1</sup> anesthesia. The following parameters were tested: cortisol, glucose, hematocrit, hemoglobin, and plasma sodium and potassium levels. The concentration of 250 mg L<sup>-1</sup> of clove oil is the most appropriate to induce surgical anesthesia, and 150 mg L<sup>-1</sup> for biometrics and brief handling. Anesthesia at the ideal concentration for 10 minutes did not result in severe stress. Only blood glucose and hematocrit were affected after anesthesia.

**Keywords:** stress, eugenol, handling, sedation.

### Introdução

Procedimentos em estações de piscicultura, normalmente, têm forte impacto sobre a fisiologia e o comportamento dos peixes, e a anestesia pode ser utilizada para facilitar o manejo e reduzir os danos físicos, tanto aos peixes como ao operador (ROSS; ROSS, 2008). De forma geral, os anestésicos atuam nos peixes deprimindo as funções neurosensoriais. A maior parte dos anestésicos afeta o sistema nervoso central e atua primeiro sobre o córtex cerebral (SUMMERFELT; SMITH, 1990). O aumento da concentração ou do tempo de exposição difunde os seus efeitos por meio do tronco cerebral

para o centro respiratório medular e da medula espinhal (SUMMERFELT; SMITH, 1990), podendo ocorrer deficiências respiratórias e colapsos medulares, o que pode ocasionar mortalidade. Desta forma, para que um anestésico seja utilizado com eficiência é importante estabelecer a sua concentração e o tempo ideal de exposição (INOUE et al., 2003).

De acordo com Ross e Ross (2008), é essencial o conhecimento da concentração ideal do anestésico que é necessária para a indução ao estágio desejado de anestesia, uma vez que estas concentrações variam conforme a espécie e o tamanho do peixe. Durante a engorda, os juvenis avançados são, na

maioria das vezes, anestesiados por dois principais motivos: 1) realização de biometria e 2) procedimento cirúrgico e inspeção visual. O estágio de indução necessário para uma biometria é a parada total dos movimentos (leve sedação), enquanto que para uma cirurgia ou inspeção visual é necessário que o peixe atinja o estágio de mínimo movimento opercular (anestesia profunda).

Normalmente, os anestésicos causam a supressão de diversas respostas de estresse, o que facilita ao animal (peixe) a manutenção de sua homeostase mesmo quando é intensamente manejado (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2009). Entretanto, alguns anestésicos, dependendo da concentração ou do tempo de exposição, podem ser causadores de estresse em peixes (BARBOSA et al., 2007; KIESSLING et al., 2009).

O óleo de cravo (cravo, planta do gênero *Eugenia*) e seus derivados têm sido intensivamente estudados como anestésicos para várias espécies de peixes e os resultados obtidos demonstram ser uma alternativa aos produtos sintéticos, normalmente utilizados (INOUE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA-DA-SILVA et al., 2009; VIDAL et al., 2008). Este anestésico tem sido eficiente em suprimir respostas de estresse em algumas espécies de peixes como o fathead minnows (*Pimephales promelas*) (PALIĆ et al., 2006) e o jundiá (*Rhamdia quelen*) (CUNHA et al., 2010).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é o peixe mais criado no Brasil e é o terceiro mais criado no mundo (FAO, 2007). Quando criada em sistema de tanque rede ou viveiro alcança até 800 g em seis meses de engorda (CAMPOS et al., 2007). Alguns trabalhos demonstraram a eficácia do uso de eugenol (óleo de cravo) para juvenis desta espécie (DERIGGI et al., 2006; VIDAL et al., 2008), mas nenhum deles avaliou a concentração ideal deste anestésico para juvenis avançados e nem a que concentração é estressante. Desta forma, idealizou-se este trabalho com o objetivo de determinar a concentração e o tempo ideal de exposição ao óleo de cravo como anestésico para juvenis avançados (50 - 90 g; 10 - 20 cm) de tilápia do Nilo durante o manejo, além de verificar as respostas de estresse dos peixes expostos à concentração ideal deste anestésico.

## Material e métodos

### Experimento 1

Sessenta juvenis de tilápia ( $55,35 \pm 15,68$  g e  $13,87 \pm 1,23$  cm) foram colocados para aclimação em três tanques de 150 L, com sistema de aeração

constante, por dez dias. Durante este período, a cada três dias, 30% da água foram trocadas e sua qualidade monitorada. Neste período, os peixes foram alimentados à vontade, três vezes por dia (8, 12 e 17h) como geralmente é realizado em pisciculturas, com ração comercial contendo 28% de proteína bruta (Propeixe 28%, Nutriave Alimentos Ltda., Viana, Estado do Espírito Santo).

Foram avaliadas seis diferentes concentrações de óleo de cravo (80; 100; 150; 200; 250 e 300 mg L<sup>-1</sup>), a fim de determinar o tempo de indução à anestesia. Os ensaios foram realizados em aquários de 6 L, contendo 3 L de água e a recuperação sempre realizada em aquários plásticos (45 L) contendo 20 L de água, com aeração constante (oxigênio dissolvido:  $7,04 \pm 1,3$  mg L<sup>-1</sup>; temperatura:  $25,37 \pm 1,34$ °C; condutividade:  $59,68 \pm 2,83$  µS cm<sup>-1</sup>; dureza:  $18,01 \pm 4,32$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>; e pH:  $6,95 \pm 0,26$ ), o oxigênio dissolvido, a temperatura e a condutividade foram medidas com um multiparâmetro YSI 85. O pH foi monitorado com potenciômetro digital Quimis Q-400. A dureza da água foi medida por titulação conforme APHA (1998). Antes de ser utilizado, o óleo de cravo (Petite Marie; Estado de São Paulo, Brasil; 90% de eugenol) foi diluído em uma concentração de 1 10<sup>-1</sup> mL em etanol a 95% para o preparo da solução-mãe. Considerando que a densidade do óleo de cravo é aproximadamente 1 g cm<sup>-3</sup>, existe 100 mg de óleo de cravo em cada mL da solução. A água do aquário foi trocada ao término de cada ensaio.

Dez peixes foram individualmente expostos, a cada concentração para se observar o tempo de indução a cada estágio, cada peixe foi exposto uma única vez durante todo o trabalho. Após 10 min., de exposição ao óleo de cravo o peixe era removido para o aquário de recuperação. Os diferentes estágios de indução à anestesia seguiram critérios propostos por Stoskopf (1993). Foi considerado recuperado o peixe que retomava totalmente os movimentos e nadava ativamente no aquário.

### Experimento 2

Foi realizado um segundo ensaio com o objetivo de se verificar a margem de segurança do anestésico. Para isso, tendo por base o resultado do primeiro experimento, a concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> foi selecionada como a mais adequada para atingir a parada total dos movimentos operculares. Analisou-se o tempo de recuperação após anestesia à concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> de óleo de cravo por diferentes tempos. Os peixes (n = 10 para cada tempo) foram previamente aclimatados e dispostos de maneira individual ao anestésico por 10, 20 e 30 min. Após a exposição, o peixe era removido para o aquário de recuperação (45 L) contendo 20 L de

água, com aeração constante. Foram avaliadas a recuperação e a mortalidade.

### Experimento 3

Para realizar o ensaio de estresse, no terceiro experimento, noventa peixes ( $47,94 \pm 10,42$  g e  $13,87 \pm 0,82$  cm) foram aclimatados em um tanque de 500 L com sistema de aeração constante, por dez dias. Durante a aclimação, a cada três dias, 30% da água foram trocadas. Neste período, os peixes foram alimentados à vontade, três vezes por dia, com ração comercial para peixes contendo 28% de proteína bruta.

Os peixes foram dispostos de maneira individual em 90 aquários de 30 L contendo 25 L de água, com aeração constante por 72h para aclimação. Também neste período, os peixes foram alimentados à vontade, três vezes por dia, com ração comercial com 28% de proteína bruta e a metade da água dos aquários foi cuidadosamente trocada uma vez, após 48h de aclimação. Após esse período a alimentação foi suspensa por 24h até o início do experimento.

O experimento foi montado em esquema fatorial com três diferentes tratamentos: controle (peixes mantidos no aquário sem manuseio e exposição ao anestésico); anestesia simulada (peixes submetidos a uma simulação do banho anestésico, somente com água sem adição do anestésico); e anestesiado (peixes expostos a  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de óleo de cravo) e seis tempos de amostragem: 0, 6, 12, 24, 48 e 96h após a anestesia.

A maior concentração de óleo de cravo testada continha em sua solução cerca de 3 mL de álcool (solvente) por litro de água, correspondendo a 0,3% do volume total. De acordo com Billiard et al. (1999), solventes como o álcool e a acetona nesta concentração não causam efeito adverso na fisiologia de peixes. Para cada combinação de tratamento com tempo foram amostrados cinco peixes. Nos tratamentos “anestesia simulada” e “anestesiado”, os peixes foram expostos individualmente em aquários de ensaio de 6 L, contendo 3 L de água (oxigênio dissolvido:  $7,04 \pm 1,3 \text{ mg L}^{-1}$ ; temperatura:  $25,37 \pm 1,34^\circ\text{C}$ ; condutividade:  $59,68 \pm 2,83 \mu\text{S cm}^{-1}$ ; dureza:  $18,01 \pm 4,32 \text{ mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$ ; e pH:  $6,95 \pm 0,26$ ) por 10 min., - tempo que foi determinado, entre os demais testados no segundo experimento, o mais adequado para exposição à anestesia.

Após o período de anestesia, foi coletado sangue da veia caudal nos diferentes tempos de amostragem para realizar as análises de cortisol, glicose, hematócrito, hemoglobina e íons plasmáticos.

A glicose sanguínea foi medida com aparelho digital Accu-Chek Active (Roche™). Para análise de hematócrito, o sangue foi colocado em capilares e centrifugado a 3.000 rpm (935 g) por 10 min., sendo

a leitura realizada em escala padronizada para hematócrito. A concentração de hemoglobina foi determinada por meio do teste colorimétrico Bioclin K023 com leitura em espectrofotômetro. O restante do sangue foi centrifugado a 3.000 rpm (1.026 g) por 10 min., sendo o plasma congelado para medida de cortisol e íons. A análise do cortisol foi realizada pela técnica de imunoenensaio enzimático por competição (EIA, Kit 55050, Human®) com leitura realizada em leitor de placa Biotrack. As concentrações plasmáticas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram determinadas diretamente em um fotômetro de chama Analyser 910 (Analyser, Estado de São Paulo, Brasil).

Durante todo o experimento, cada peixe foi utilizado (anestesiado) uma única vez, para não alterar os resultados.

### Análise estatística

Os tempos para atingir os diferentes estágios de anestesia e recuperação, assim como o tempo de recuperação após diferentes tempos de exposição à anestesia, foram avaliados para as diferentes concentrações de óleo de cravo por análise de variância, seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os parâmetros de estresse foram analisados por análise de variância de dois fatores e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), tendo o tratamento e o tempo como fatores. As análises estatísticas foram realizadas valendo-se do programa Sigma Stat (Versão 3.5 - 2006, Systat Software, Inc.). Para cada estágio de anestesia foi realizada uma regressiva potencial e para a recuperação foi realizada uma regressiva exponencial.

## Resultados e discussão

### Experimento 1

Com base nos resultados, observou-se que somente a concentração de  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de óleo de cravo não induziu os peixes a todos os estágios de anestesia. Os peixes anestesiados com 250 e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  alcançaram os estágios de perda total de equilíbrio e parada dos batimentos operculares em tempos significativamente menores que os demais. Os peixes anestesiados em ambas as concentrações não apresentaram diferença significativa na recuperação. Desta forma, esta faixa de concentração ( $250 - 300 \text{ mg L}^{-1}$ ) pôde ser considerada a ideal para anestesia cirúrgica. Do ponto de vista econômico, a concentração de  $250 \text{ mg L}^{-1}$  foi a mais adequada pois com uma menor concentração atingiu-se o efeito desejado (Tabela 1). Simões et al. (2010), testando o mesmo anestésico em adultos de tilápia do Nilo, também estabeleceram a concentração de  $250 \text{ mg L}^{-1}$  como adequada para anestesia cirúrgica.

**Tabela 1.** Tempo, em segundos, de indução aos estágios de anestesia de juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo (mg L<sup>-1</sup>). Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre as concentrações no mesmo estágio (Anova e teste de Tukey p < 0,05); os resultados estão apresentados como média ± erro-padrão da média - indica que a concentração não alcançou ao estágio de anestesia. Estágios de anestesia de acordo com Stoskopf (1993).

Óleo de cravo (mg L <sup>-1</sup> )	Eventos Comportamentais (segundos)					
	Perda de reação a estímulos	Perda parcial de equilíbrio	Perda total de equilíbrio	Redução dos batimentos operculares	Parada dos batimentos operculares	Recuperação
80	30,2 ± 1,4 <sup>a</sup>	48,4 ± 3,4 <sup>a</sup>	158,9 ± 7,3 <sup>a</sup>	234,8 ± 9,9 <sup>a</sup>	-	282,8 ± 15,2 <sup>a</sup>
100	17,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	30,9 ± 2,1 <sup>b</sup>	131,7 ± 5,7 <sup>b</sup>	223,6 ± 10,4 <sup>a</sup>	489,1 ± 23,1 <sup>a</sup>	268,3 ± 14,5 <sup>a</sup>
150	13,4 ± 0,8 <sup>c</sup>	23,8 ± 1,4 <sup>c</sup>	67,5 ± 4,9 <sup>c</sup>	87,9 ± 5,1 <sup>b</sup>	127,0 ± 5,7 <sup>b</sup>	245,4 ± 11,6 <sup>b</sup>
200	10,7 ± 0,6 <sup>c</sup>	23,5 ± 1,4 <sup>c</sup>	68,6 ± 2,4 <sup>c</sup>	83,5 ± 2,6 <sup>b</sup>	117,4 ± 4,2 <sup>b</sup>	331,1 ± 17,9 <sup>c</sup>
250	12,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	22,2 ± 0,9 <sup>c</sup>	49,6 ± 5,3 <sup>d</sup>	63,8 ± 5,2 <sup>c</sup>	79,5 ± 4,3 <sup>c</sup>	433,0 ± 37,0 <sup>d</sup>
300	12,4 ± 0,7 <sup>c</sup>	21,1 ± 0,7 <sup>c</sup>	38,3 ± 2,1 <sup>c</sup>	47,7 ± 2,1 <sup>d</sup>	60,0 ± 2,9 <sup>d</sup>	477,3 ± 42,6 <sup>d</sup>
Equações	$\hat{y} = 325,68x^{-0,604}$ R <sup>2</sup> = 0,70	$\hat{y} = 429,78x^{-0,544}$ R <sup>2</sup> = 0,81	$\hat{y} = 15122x^{-1,042}$ R <sup>2</sup> = 0,96	$\hat{y} = 55723x^{-1,238}$ R <sup>2</sup> = 0,95	$\hat{y} = 1E+06x^{-1,78}$ R <sup>2</sup> = 0,92	$\hat{y} = 198,28e^{0,0028x}$ R <sup>2</sup> = 0,81

Em que: y = tempo para atingir aos estágios e x = concentração de eugenol (mg L<sup>-1</sup>).

Estudos realizados por Vidal et al. (2008), com tilápias (peso médio de 5,34 g) e Cunha et al. (2010), com jundiás (peso médio de 2,14 g), obtiveram concentrações adequadas mais baixas que a do presente trabalho (75 e 50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente). Esta diferença no resultado deve estar relacionada com a espécie e, principalmente, com o tamanho do peixe (ROSS; ROSS, 2008). Peixes menores têm uma superfície branquial comparativamente maior do que peixes grandes, desta forma são induzidos à anestesia com uma concentração menor (ROUBACH et al., 2005).

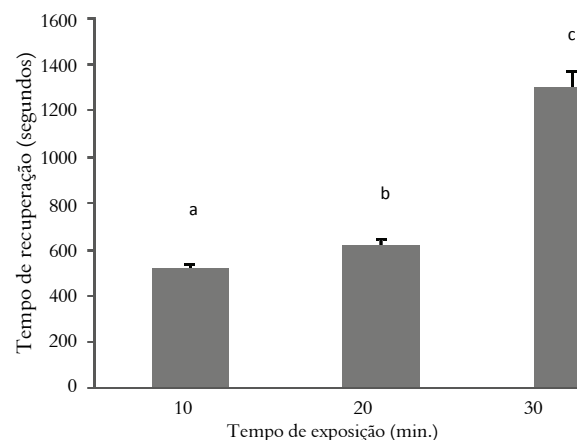
Os peixes anestesiados com 80, 100, 150 e 200 mg L<sup>-1</sup> de óleo de cravo apresentaram rápida recuperação. Entretanto, apenas os peixes expostos a 150 e 200 mg L<sup>-1</sup> apresentaram um tempo significativamente menor de indução ao estágio de perda total de equilíbrio. Sendo assim, 150 mg L<sup>-1</sup> foi considerada a concentração ideal para uma anestesia voltada para o breve manejo (Tabela 1). Esta concentração representa apenas 60% da concentração determinada para anestesia cirúrgica. Próximo ao resultado encontrado em adultos de tilápia (SIMÕES et al., 2010), em que a concentração de anestesia voltada para o breve manejo (100 mg L<sup>-1</sup>) representa 40% da concentração determinada para anestesia cirúrgica (250 mg L<sup>-1</sup>).

Simões e Gomes (2009) avaliaram o mentol como anestésico em juvenis de tilápias e obtiveram resultados semelhantes em que a concentração para breve manejo (150 - 200 mg L<sup>-1</sup>) foi de 60 - 80% da concentração selecionada para anestesia cirúrgica (250 mg L<sup>-1</sup>).

Além da concentração, a determinação do tempo adequado de exposição é essencial para a eficácia do anestésico, uma vez que exposições prolongadas podem eventualmente causar mortalidade dos peixes (PARK et al., 2008).

## Experimento 2

No experimento 2, observou-se diferença significativa no tempo de recuperação dos peixes após a exposição a 250 mg L<sup>-1</sup> de óleo de cravo por diferentes períodos de tempo (Figura 1). O óleo de cravo demonstrou boa margem de segurança para juvenis avançados de tilápia, pois não foi observada mortalidade dos peixes expostos ao anestésico em nenhum dos tempos avaliados. Estudo de Roubach et al. (2005) também demonstrou que a concentração ideal (65 mg L<sup>-1</sup>) não provocou mortalidade em juvenis avançados de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em até 30 min., de exposição ao eugenol. Essa amplitude do intervalo de concentrações ideais é resultado das diferentes velocidades de ação do eugenol para cada espécie de peixe (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004).



**Figura 1.** Tempo de recuperação de juvenis avançados de tilápia nilótica após a exposição por diferentes tempos a 250 mg L<sup>-1</sup> de óleo de cravo. Letras diferentes nas colunas significam diferença significativa (p < 0,05).

Resultado diferente foi encontrado em tilápia de 5 g em que a concentração de 286,55 mg L<sup>-1</sup> de eugenol provoca aproximadamente 100% de mortalidade em 10 min., de anestesia (VIDAL et al., 2008). Há duas principais explicações para esta

diferença: 1) tamanho do peixe, sendo os menores mais sensíveis ao efeito tóxico de soluções anestésicas do que peixes maiores; 2) produto utilizado. Vidal et al. (2008) realizaram os experimentos com eugenol purificado, enquanto no presente trabalho foi utilizado óleo de cravo que contém outros compostos além do eugenol, necessitando, portanto, de maior concentração para atingir o mesmo efeito.

### Experimento 3

As concentrações de cortisol encontradas nos peixes do tratamento-controle ao longo deste experimento (entre  $1,1 \pm 0,1$  e  $3,83 \pm 2,44$  ng mL<sup>-1</sup>) estão dentro da faixa basal para peixes de acordo com Barton et al. (2002). Apenas os peixes do tratamento com anestesia simulada apresentaram elevação significativa na concentração deste hormônio no tempo 0h. De toda forma, o estresse do manejo necessário para anestesia (tratamento com anestesia simulada) é de baixa intensidade, uma vez que 6h após a anestesia, os peixes deste tratamento já apresentavam a concentração de cortisol inicial, equivalente à do controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores do cortisol, glicose, hematócrito e hemoglobina de tilápia nilótica, em diferentes tempos amostrais após a anestesia, com 250 mg L<sup>-1</sup> de óleo de cravo. Letras minúsculas indicam diferença significativa dos tratamentos nos diferentes tempos de recuperação ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos em cada tempo de recuperação ( $p < 0,05$ ).

Recuperação (horas)	Tratamento		
	Controle	Anestesia Simulada Cortisol (ng mL <sup>-1</sup> )	Anestesia
0	1,10 ± 0,10 <sup>aA</sup>	75,0 ± 6,85 <sup>bB</sup>	1,10 ± 0,10 <sup>aA</sup>
6	3,83 ± 2,44 <sup>aA</sup>	5,25 ± 2,14 <sup>aA</sup>	1,29 ± 0,17 <sup>aA</sup>
12	1,10 ± 0,10 <sup>aA</sup>	3,66 ± 2,22 <sup>aA</sup>	1,10 ± 0,10 <sup>aA</sup>
24	1,10 ± 0,10 <sup>aA</sup>	2,66 ± 1,39 <sup>aA</sup>	3,67 ± 2,29 <sup>aA</sup>
48	1,10 ± 0,10 <sup>aA</sup>	5,69 ± 2,25 <sup>aA</sup>	2,69 ± 1,42 <sup>aA</sup>
96	1,35 ± 0,22 <sup>aA</sup>	1,12 ± 0,20 <sup>aA</sup>	2,01 ± 0,58 <sup>aA</sup>
	Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )		
0	46,0 ± 2,3 <sup>aA</sup>	49,2 ± 1,6 <sup>aA</sup>	85,2 ± 5,9 <sup>bB</sup>
6	34,8 ± 1,2 <sup>bA</sup>	43,0 ± 4,9 <sup>aA</sup>	43,0 ± 2,6 <sup>bA</sup>
12	34,4 ± 3,5 <sup>bA</sup>	39,6 ± 3,1 <sup>aA</sup>	41,8 ± 3,4 <sup>bA</sup>
24	37,8 ± 1,8 <sup>bA</sup>	43,2 ± 2,2 <sup>aA</sup>	41,8 ± 1,3 <sup>bA</sup>
48	35,4 ± 0,6 <sup>bA</sup>	47,0 ± 2,7 <sup>bB</sup>	44,2 ± 3,0 <sup>bB</sup>
96	38,0 ± 3,7 <sup>bA</sup>	36,8 ± 2,3 <sup>aA</sup>	39,2 ± 1,5 <sup>bA</sup>
	Hematócrito (%)		
0	27,2 ± 0,9 <sup>aA</sup>	30,7 ± 1,2 <sup>aB</sup>	33,4 ± 1,1 <sup>bB</sup>
6	23,0 ± 1,2 <sup>bA</sup>	23,5 ± 1,2 <sup>bA</sup>	23,9 ± 0,6 <sup>bA</sup>
12	21,56 ± 1,1 <sup>bA</sup>	21,5 ± 0,4 <sup>aA</sup>	21,8 ± 1,2 <sup>bA</sup>
24	24,9 ± 0,7 <sup>aA</sup>	26,4 ± 0,6 <sup>bA</sup>	26,3 ± 1,2 <sup>bA</sup>
48	20,1 ± 0,9 <sup>aA</sup>	20,0 ± 0,7 <sup>aA</sup>	21,8 ± 0,8 <sup>bA</sup>
96	20,1 ± 1,0 <sup>bA</sup>	21,4 ± 0,9 <sup>aA</sup>	21,4 ± 0,4 <sup>bA</sup>
	Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )		
0	9,67 ± 1,93 <sup>aA</sup>	7,47 ± 1,25 <sup>aA</sup>	5,39 ± 0,71 <sup>aA</sup>
6	7,42 ± 0,78 <sup>aA</sup>	7,89 ± 0,86 <sup>aA</sup>	10,35 ± 1,44 <sup>bA</sup>
12	4,84 ± 0,48 <sup>aA</sup>	5,47 ± 0,98 <sup>bA</sup>	6,01 ± 0,68 <sup>aA</sup>
24	7,79 ± 1,35 <sup>aA</sup>	5,41 ± 0,79 <sup>bB</sup>	4,27 ± 0,49 <sup>bB</sup>
48	3,15 ± 0,3 <sup>bA</sup>	3,89 ± 0,62 <sup>bA</sup>	3,96 ± 0,34 <sup>aA</sup>
96	4,62 ± 0,48 <sup>aA</sup>	5,74 ± 0,71 <sup>bA</sup>	5,05 ± 0,10 <sup>aA</sup>

O óleo de cravo foi eficiente em suprimir as respostas de cortisol durante o manejo da anestesia, uma vez que não houve alteração deste hormônio nos peixes anestesiados em nenhum tempo de amostragem. Este resultado é similar ao obtido por Cunha et al. (2010) em que jundiás anestesiados com eugenol apresentaram os níveis plasmáticos de cortisol significativamente mais baixos do que os peixes-controle, reforçando a hipótese de que este anestésico previne o aumento do cortisol no momento da manipulação e exposição ao ar. Não se sabe como este anestésico interfere com a dinâmica do cortisol em peixes (KING et al., 2005; PALIĆ et al., 2006). Entretanto, é relatado que o óleo de cravo deprime as funções neurosensoriais, causando bloqueio à estimulação nervosa das células interrenais, suprimindo assim, a liberação de cortisol na corrente sanguínea (SUMMERFELT; SMITH, 1990). Por analogia, esse seria o mecanismo de ação na tilápia.

A glicose sanguínea foi significativamente maior logo após a anestesia (tempo 0h) no tratamento anestesiado (85,2 mg dL<sup>-1</sup>) e controle (46,0 mg dL<sup>-1</sup>) quando comparada aos outros tempos de amostragem. Não foi observada diferença significativa no tratamento anestesia simulada, nos diferentes tempos amostrados. As concentrações de glicose voltaram para os valores basais 6h após anestesia em todos os tratamentos (Tabela 2), apresentando apenas pequena diminuição nos peixes-controle, no tempo 48h. Deriggi et al. (2006), anestesiando juvenis avançados de tilápia do Nilo com concentrações de eugenol abaixo (20 e 80 mg L<sup>-1</sup>) das avaliadas neste estudo (250 mg L<sup>-1</sup>), também observaram aumento da glicose logo após a anestesia e um retorno a valores basais 6h após a anestesia.

Esta rápida elevação na glicose de juvenis avançados de tilápia anestesiados com eugenol (DERIGGI et al., 2006) e com óleo de cravo (presente trabalho) parece ser um padrão independente da concentração do anestésico. Outras espécies como a carpa comum (*Cyprinus carpio*) (VESÍSEK et al., 2005b), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (VESÍSEK et al., 2005a) e o mero (*Epinephelus bruneus*) (PARK et al., 2008) também apresentaram elevação na concentração de glicose após exposição ao óleo de cravo. A mobilização de glicose, a partir do glicogênio estocado no fígado dos animais, ocorre sempre que há sinal externo de estresse. Diferente de outros metabólitos, a glicose pode tanto ser utilizada anaerobicamente para geração de energia, em situações onde falta o oxigênio, como em situações onde o exercício muscular é necessário por meio do metabolismo anaeróbico. O manuseio para aplicar o anestésico exige do animal uma reação muscular

(comum em peixes) para a natação de arranque na tentativa de fuga, o que desencadeia a glicólise anaeróbica, requerendo maiores concentrações de glicose plasmática sem que haja, no entanto, alterações nos níveis de cortisol.

Os valores de hematócrito foram significativamente maiores logo após a anestesia (0h) em todos os tratamentos avaliados (controle -27,2%; anestesia simulada -30,7%; e anestesiado -33,4%). O hematócrito dos peixes do tratamento-controle foi menor ( $p < 0,05$ ), enquanto o hematócrito dos peixes do tratamento anestesiado foi maior ( $p < 0,05$ ) logo após a anestesia (tempo 0h). O tratamento de anestesia simulada apresentou valores menores de hematócrito nos tempos 12, 48 e 96h após a anestesia simulada (Tabela 2). O aumento do hematócrito, como observado, indica hemoconcentração ocasionada pelo aumento da demanda de oxigênio, e tem a finalidade de auxiliar o peixe a retornar da situação de estresse (MORALES et al., 2005). A hemoconcentração pode ser causada pelo aumento de células circulantes por conta de uma contração esplênica ou em decorrência de uma saída de água do sistema, aumentando o número de eritrócitos circulantes por unidade de volume. Este estudo corrobora aquele realizado por Tort et al. (2002), no qual a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresenta aumento nos valores de hematócrito quando exposta ao óleo de cravo e seus derivados.

Os valores de concentração de hemoglobina ([Hb]) dos peixes do tratamento-controle ( $3,15 \text{ g dL}^{-1}$ ) e anestesia simulada ( $3,89 \text{ g dL}^{-1}$ ) apresentaram valores significativamente menores no tempo 48h após a anestesia. No entanto, os valores de [Hb] dos peixes do tratamento anestesiado foram maiores ( $10,35 \text{ g dL}^{-1}$ ) no tempo 6h após a anestesia bem como nos peixes do tratamento-controle ( $7,79 \text{ g dL}^{-1}$ ). Nos peixes do tratamento anestesiado a [Hb] foi significativamente menor ( $4,27 \text{ g dL}^{-1}$ ) no tempo 24h após a anestesia (Tabela 2).

Os valores plasmáticos de  $\text{Na}^+$  nos peixes em diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas, o que indica que os procedimentos experimentais, aparentemente, não tiveram intensidade nem duração suficientes para induzir alterações no balanço eletrolítico deste íon na tilápia (Tabela 3). Os peixes expostos ao anestésico também não apresentaram nenhuma alteração no  $\text{K}^+$  plasmático (Tabela 3). Deriggi et al. (2006) relatam que as concentrações de íons plasmáticos em tilápia do Nilo não foi afetada pela exposição ao eugenol. Isto sugere que o uso de óleo de cravo ou de seus derivados não ocasiona distúrbios osmorregulatórios em juvenis avançados de tilápia.

**Tabela 3.** Sódio e potássio plasmáticos de tilápia nilótica, em diferentes tempos amostrais após a anestesia, com  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de óleo de cravo. Letras minúsculas indicam diferença significativa dos tratamentos nos diferentes tempos de recuperação por ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos em cada tempo de recuperação ( $p < 0,05$ ).

Recuperação (horas)	Tratamentos		
	Controle	Anestesia Simulada	Anestesia
	Sódio ( $\text{mEq L}^{-1}$ )		
0	$58,7 \pm 5,72^{\text{a}}$	$59,8 \pm 4,42^{\text{a}}$	$54,0 \pm 3,19^{\text{a}}$
6	$74,6 \pm 5,49^{\text{a}}$	$66,4 \pm 5,18^{\text{a}}$	$69,8 \pm 9,45^{\text{a}}$
12	$56,0 \pm 2,12^{\text{a}}$	$55,5 \pm 2,77^{\text{a}}$	$54,2 \pm 7,48^{\text{a}}$
24	$62,8 \pm 5,11^{\text{a}}$	$47,8 \pm 5,02^{\text{a}}$	$61,4 \pm 3,41^{\text{a}}$
48	$53,4 \pm 5,56^{\text{a}}$	$52,2 \pm 3,06^{\text{a}}$	$50,6 \pm 5,12^{\text{a}}$
96	$55,0 \pm 7,09^{\text{a}}$	$52,2 \pm 4,03^{\text{a}}$	$52,2 \pm 6,30^{\text{a}}$
	Potássio ( $\text{mEq L}^{-1}$ )		
0	$1,20 \pm 0,11^{\text{a}}$	$1,08 \pm 0,07^{\text{a}}$	$0,86 \pm 0,07^{\text{a}}$
6	$2,16 \pm 0,19^{\text{a}}$	$1,56 \pm 0,27^{\text{ab}}$	$1,68 \pm 0,33^{\text{a}}$
12	$1,50 \pm 0,13^{\text{a}}$	$1,20 \pm 0,31^{\text{ab}}$	$1,34 \pm 0,20^{\text{a}}$
24	$1,18 \pm 0,39^{\text{a}}$	$0,88 \pm 0,16^{\text{a}}$	$1,38 \pm 0,17^{\text{a}}$
48	$1,42 \pm 0,17^{\text{a}}$	$2,08 \pm 0,32^{\text{a}}$	$1,52 \pm 0,32^{\text{a}}$
96	$1,42 \pm 0,24^{\text{a}}$	$1,22 \pm 0,13^{\text{a}}$	$2,04 \pm 0,32^{\text{a}}$

## Conclusão

A concentração  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de óleo de cravo é a mais adequada para indução de anestesia cirúrgica. Para a anestesia voltada para biometria e breve manejo, a concentração mais adequada é  $150 \text{ mg L}^{-1}$ . A exposição à concentração ideal de óleo de cravo por 10 min., não causou estresse severo, ocorrendo alterações após a anestesia somente nos níveis de glicose e hematócrito.

## Agradecimentos

Trabalho financiado por projeto interno UVV/Funadesp (9/2009). A. L. Val, V. M. F. Almeida-Val e L. C. Gomes são bolsistas de produtividade do CNPq.

## Referências

- APHA-American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18th ed. New York: American Public Health Association, 1998. p. 1050.
- BARBOSA, L. G.; MORAES, G.; INOUE, L. A. K. A. Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 255-260, 2007.
- BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: ADAMS, S. M. (Ed.). **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Bethesda: American Fisheries Society, 2002. p. 213-278.
- BILLIARD, S. M.; QUERBACH, K.; HODSON, P. V. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2070-2077, 1999.

- CAMPOS, C. M.; GANECO, L. N.; CASTELLANI, D.; MARTINS, M. I. E. Avaliação econômica da criação de tilápias em tanque-rede, município de Zacarias. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 2, p. 265-271, 2007.
- CUNHA, M. A.; ZEPPEFELD, C. C.; GARCIA, L. D.; LORO, V. L.; FONSECA, M. B.; EMANUELLI, T.; VEECK, A. P. D.; 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, n. 10, p. 2107-2114, 2010.
- DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus): Assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fish Stats Plus**: universal software for fishery statistical time series: version 2.32. Rome: FAO, 2007.
- HOSKONEN, P.; PIHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 4, p. 1136-1142, 2004.
- INOUE, L. A. K. A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L.; RIBEIRO, P. T.; SILVA, A. M. D.; AFFONSO, E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 2, p. 327-332, 2011.
- KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, v. 286, n. 3-4, p. 301-308, 2009.
- 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, n. 14, p. 1442-1449, 2005.
- MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, p. 158-178, 2009.
- MORALES, A. E.; CARDENETE, G.; ABELLÁN, E.; GARCÍA-REJÓN, L. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 1, p. 33-40, 2005.
- OLIVEIRA, J. R.; CARMO, J. L.; OLIVEIRA, K. K. C.; SOARES, M. C. F. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1163-1169, 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, 1820). **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 675-685, 2006.
- PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, SOO-YEON.; SEOL, DONG-WON; LEE, J.; PARK, IN-SEOK. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 8, p. 877-884, 2008.
- PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F.; RIBEIRO, M. A. R.; COPPOLA, M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1851-1856, 2009.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. p. 240.
- 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, n. 11, p. 1056-1061, 2005.
- SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613-620, 2009.
- SIMÕES, L. N.; PAIVA, G.; GOMES, L. C. Óleo de cravo como anestésico para adultos de tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1472-1477, 2010.
- STOSKOPF, M. Anaesthesia. In: BROWN, L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. London: Pergamon Veterinary Handbook Series, 1993. p. 161-168.
- SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L. S. Anesthesia, surgery and related techniques. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). **Methods for fish biology**. Maryland: American Fisheries Society, 1990. p. 213-278.
- TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADROS, F. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, n. 11, p. 907-910, 2002.
- VELÍSEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIACKOVÁ, V. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria Brno**, v. 74, n. 1, p. 139-146, 2005a.
- VESÍSEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V.; GROCH, L.; NEPEJHALOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinary Medicine**, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005b.
- VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; MECÊDO, G. R. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

Received on March 30, 2011.

Accepted on June 15, 2011.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.