

EUGENOL EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO: CONCENTRAÇÕES E ADMINISTRAÇÕES SUCESSIVAS

Marina Carvalho DELBON¹ e Maria José Tavares RANZANI PAIVA²

RESUMO

Diversos anestésicos são aplicados na aquicultura, tendo por finalidade reduzir o estresse dos peixes ocasionado pelo manejo. Na prática, o anestésico mais utilizado é a benzocaína, mas vários autores estão trabalhando com o eugenol. Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar a ação desses fármacos sobre os estágios anestésicos em *Oreochromis niloticus* e avaliar a ação da administração sucessiva de eugenol sobre os estágios anestésicos. No primeiro ensaio, os peixes ($47,73 \pm 8,73$ g e $14,23 \pm 0,81$ cm) foram submetidos a cinco concentrações de eugenol (40, 60, 80, 100 e 120 mg L⁻¹) e uma de benzocaína (100 mg L⁻¹). As concentrações anestésicas testadas foram capazes de induzir os peixes a todos os estágios de anestesia e revelaram relação inversa entre os tempos de indução e o aumento das concentrações. A concentração mínima de eugenol, para induzir anestesia, foi de 100 mg L⁻¹. No segundo ensaio, os juvenis ($38,07 \pm 5,00$ g e $12,7 \pm 0,54$ cm) foram expostos às concentrações de 60, 80, 100 mg L⁻¹ de eugenol, determinadas no primeiro ensaio. Avaliando-se as diferenças nos parâmetros analisados entre os dias sucessivos, pode-se observar que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os estágios anestésicos nas concentrações de eugenol testadas, sugerindo que o resíduo de eugenol é eliminado do organismo do peixe em até 24 horas.

Palavras chave: Aquicultura; estágios anestésicos; *Oreochromis niloticus*

EUGENOL IN TILAPIA JUVENILE: CONCENTRATIONS AND SUCCESSIVE ADMINISTRATIONS

ABSTRACT

Several anesthetics are used in aquaculture to reduce the stress caused by management. In the field, the most common anesthetic is benzocaine, but several authors are researching about eugenol. The objective of this study were to compare the action of these drugs on the anesthetics stages and measure the effects of successive administration of eugenol on the anesthetics stages in *Oreochromis niloticus*. In the first test, fish (47.73 ± 8.73 g and 14.23 ± 0.81 cm) were subjected to five concentrations of eugenol (40, 60, 80, 100 and 120 mg L⁻¹) and one of benzocaine (100 mg L⁻¹). All the anesthetic concentrations tested were able to induce fish to all stages of anesthesia, and revealed an inverse relationship between the induction times and increased concentrations. The minimum concentration of eugenol to induce anesthesia was 100 mg L⁻¹. In the second test, the juveniles (38.07 ± 5.00 g and 12.70 ± 0.54 cm) were exposed to concentrations of 60, 80, 100 mg L⁻¹ of eugenol, as determined in the first test. Evaluating the differences between successive days, there was no significant difference ($P > 0.05$) between anesthetics stages in the concentrations of eugenol tested, suggesting that the residue of eugenol was removed from the fish in less than 24 hours.

Key words: Aquaculture; stages of anesthesia; *Oreochromis niloticus*

Artigo Científico: Recebido em 23/04/2011 – Aprovado em 20/01/2012

¹ Doutora. CAUNESP - UNESP. Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n - CEP: 14.884-900 - Jaboicabal - SP - Brasil. e-mail: marinadelbon@yahoo.com.br (autor correspondente)

² Pesquisador Científico. Instituto de Pesca. Caixa Postal 61070 - CEP: 0.5001-970 - São Paulo - SP - Brasil. e-mail: mase@pesca.sp.gov.br

INTRODUÇÃO

Práticas realizadas na aquicultura, como biometria, análise patológica, implante hormonal e transporte, frequentemente expõem os peixes a uma variedade de fatores estressantes, que têm o potencial de afetar seu desempenho (BARTON, 2000). Além disso, diversos estudos têm revelado que os peixes podem sentir dor e medo, com possíveis alterações metabólicas (SNEDDON, 2003; CHANDROO *et al.*, 2004; DUNLOP e LAMING, 2005).

Para facilitar o manejo, visando amenizar a intensidade do estresse destas atividades, têm-se utilizado anestésicos, que podem ser injetados no peixe, no entanto, a maioria é administrada diluída na água (BOWSER, 2001). Deste modo, o anestésico, através das brânquias e da pele, entra no sistema circulatório do animal, deprimindo as funções neurosensoriais e bloqueando algumas ações reflexas (SUMMERFELT e SMITH, 1990).

A anestesia é alcançada quando ocorre uma perda completa ou parcial dos sentidos corporais devido à diminuição das funções nervosas (IWANA e ACKERMAN, 1994). Biologicamente, o procedimento tem por objetivo reduzir o estresse nos peixes sem causar problemas no crescimento e na reprodução. Do ponto de vista econômico, a utilização de uma dose correta do anestésico é fundamental para evitar desperdícios ou a morte dos peixes pelo excesso de exposição ao produto (ROUBACH e GOMES, 2001).

Entretanto, o anestésico pode se acumular no organismo dos animais por um determinado tempo e, para eliminar esses resíduos, é necessário que haja depuração. O tempo deste processo depende do tipo da droga utilizada, da espécie alvo, da concentração do anestésico e da via de administração utilizados, que pode ser de algumas horas a várias semanas (BOOTH, 1988). Mesmo que os resíduos anestésicos presentes nos peixes não sejam prejudiciais ao consumo humano, segundo STONE e TOSTIN (1999), estes podem afetar o sabor natural do peixe, quando forem consumidos.

São conhecidos diversos fármacos destinados à anestesia de peixes, mas o único anestésico aprovado pelo "Food and Drug Administration" (FDA) é o MS-222 e, de acordo com ROUBACH *et al.* (2001), essa substância química é tóxica. No

Brasil, o anestésico mais utilizado é a benzocaína (GOMES *et al.*, 2001). Este anestésico atende à maioria dos critérios estabelecidos por ROSS e ROSS (1999) como ideal para peixes, por ser eficaz e possuir boa margem de segurança. No entanto, a benzocaína e o MS-222 são derivados do ácido p-aminobenzóico (TYTLER e HAWKINS, 1981), e são necessários 21 dias para depuração dos peixes submetidos a essas drogas, para posteriormente serem destinados ao consumo humano (ROSS e ROSS, 1999). Para a tilápia, *Oreochromis niloticus*, espécie introduzida no Brasil e de grande importância na piscicultura nacional, é comum a utilização de benzocaína como anestésico.

Dessa forma, procurando anestésicos menos residuais e menos agressivos, pesquisas com anestésicos de fontes naturais começaram a surgir. Dentre esses produtos pode-se mencionar o óleo de cravo, uma substância fenólica obtida da destilação das folhas, caule e flores do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), que apresenta na composição, de 70 a 95% do seu princípio ativo, o eugenol (MAZZAFERA, 2003), um depressor do sistema nervoso central (SNC) (ANDERSON *et al.*, 1997).

Diversos estudos sugerem que o eugenol é uma alternativa efetiva para a sedação e anestesia de peixes e pode ter vários benefícios sobre outros métodos, principalmente pelo seu baixo custo, elevada disponibilidade e ausência de propriedades tóxicas aparentes (INOUE *et al.*, 2003). Trata-se de um anestésico seguro, de grande eficácia e ampla margem de segurança para peixes (KEENE *et al.*, 1998).

Nesse sentido, objetivou-se a comparação da ação da benzocaína em relação a diferentes concentrações de eugenol na indução (sedação leve, sedação profunda e anestesia) e recuperação anestésica de tilápias. Avaliou-se, também, a ação da administração sucessiva de diferentes concentrações de eugenol (24 horas após a primeira anestesia) sobre os estágios de indução e recuperação anestésica, já que vários autores discordam sobre o tempo de depuração do eugenol. De acordo com WAGNER *et al.* (2002), este fármaco é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo tempo de depuração (SLADKY *et al.*, 2001; WOODY *et al.*, 2002). Porém, GUENETTE

et al. (2007), sugerem que, com administrações sucessivas de eugenol, ocorre acúmulo deste anestésico no organismo dos peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesca, em São Paulo/SP, entre os dias 20 a 29 de fevereiro de 2008. Para a realização dos experimentos, foram utilizados juvenis de tilápia ($n = 66$; $39,34 \pm 5,86$ g e $13,46 \pm 0,86$ cm) provenientes do Pólo Regional da APTA do Vale do Ribeira, município de Pariquera-Açu/SP. Durante a aclimação de dez dias, a qualidade da água foi monitorada diariamente. Nesse período, os peixes foram mantidos em caixas de polietileno com capacidade para 1.000 L, com aeração constante, e alimentados com ração extrusada, com 28% de proteína bruta até a saciedade aparente, uma vez ao dia.

Foram realizados dois ensaios em aquários de vidro com volume útil de 20 L, com 5 L de água. Diariamente, foram monitoradas as variáveis de qualidade de água: temperatura, oxigênio dissolvido e pH. Em cada aquário, o sistema de aeração foi constante, mantido por meio de pedra porosa acoplada a um soprador. A água do aquário foi trocada ao término de cada indução anestésica.

Antes dos ensaios, foram preparadas soluções-mãe dos anestésicos benzocaína e eugenol, ambas nas concentrações de 100 mg L^{-1} , e armazenadas a -20°C . Para a solução-mãe, diluiu-

se uma concentração de 1 mL do anestésico em 10 mL de etanol absoluto PA (99,9%). A benzocaína foi obtida da Sigma (lote n° E1501), e o eugenol, da Sigma-Aldrich (lote n° E51791), ambos com padrões de alta pureza.

Em cada experimento foi utilizado um grupo-controle, em água sem anestésico, para monitoramento dos parâmetros comportamentais e possível mortalidade durante os procedimentos.

1º ensaio: Determinação da concentração anestésica

Os testes foram conduzidos em 36 aquários, com 5 L de água, sendo seis aquários para cada tratamento. Os peixes ($n = 36$; $47,73 \pm 8,73$ g e $14,23 \pm 0,81$ cm) foram individualmente expostos a concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 mg L^{-1} de eugenol e 100 mg L^{-1} de benzocaína.

As concentrações de eugenol testadas foram estabelecidas a partir dos resultados observados em outros trabalhos (WOODY *et al.*, 2002; DELBON, 2006; VIDAL *et al.*, 2008), e a concentração de 100 mg L^{-1} de benzocaína foi utilizada como referência por ser considerada ideal na anestesia de juvenis de tilápia (COYLE *et al.*, 2004).

Após adicionar o anestésico à água do aquário, cada peixe foi monitorado, com o auxílio de cronômetro, para determinação do tempo para atingir os estágios anestésicos avaliados. Os estágios anestésicos basearam-se em visualização comportamental, de acordo com WOODY *et al.* (2002) e estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Estágios de indução anestésica avaliados (WOODY *et al.*, 2002).

Estágios de indução anestésica	Características comportamentais
1- sedação leve	diminuição do movimento opercular
2- sedação profunda	perda de equilíbrio caracterizada pela natação sem coordenação
3- anestesia	perda total de reação ao estímulo

Após os peixes atingirem o terceiro estágio, foi realizada biometria, simulando um manejo de rotina na piscicultura. Após a biometria, os peixes foram colocados em aquários com 10 L de água livre de anestésico, para avaliação do tempo de recuperação. Entendeu-se por recuperação o momento em que os peixes voltaram ao comportamento normal de natação. Após a

recuperação, os peixes foram mantidos nos aquários, com aeração constante e alimentação diária com ração comercial. A taxa de mortalidade foi avaliada durante 48h após indução anestésica.

2º ensaio: Anestésias sucessivas (após 24 horas)

Os testes foram conduzidos em 30 aquários com 5 L de água, sendo seis aquários para cada

tratamento. Os peixes ($n = 30$, $38,07 \pm 5,00$ g e $12,7 \pm 0,54$ cm) foram individualmente expostos a concentrações de 60, 80, 100 mg L⁻¹ de eugenol, determinadas no experimento 1, e os procedimentos e os estágios anestésicos avaliados foram os mesmos do experimento anterior.

Após atingirem o terceiro estágio anestésico, foi realizada biometria e os juvenis de tilápia foram colocados, individualmente, em aquários de 10 L de água isenta de anestésico, com aeração constante, para monitorar a recuperação. Vinte e quatro horas após anestesia, os mesmos animais tratados, foram novamente anestesiados sob as mesmas concentrações e acompanhados quanto à mortalidade, durante 48 horas.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico "ANOVA" e teste Tukey, comparando a diferença entre as médias dos tratamentos por tempo e entre as concentrações, adotando-se um

nível de significância de 5% (ZAR, 1996). Nos testes para indução e recuperação anestésica foram realizadas análises de regressão (concentração eugenol x tempo de indução da anestesia; concentração eugenol x tempo de recuperação da anestesia).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois ensaios, as variáveis de qualidade de água avaliadas permaneceram dentro de faixas recomendadas para a espécie (MARTINS, 2004), evitando-se possível interferência da qualidade da água no desempenho e saúde dos animais (Tabelas 1, 2 e 3). Estes resultados sugerem que os principais responsáveis pelo tempo necessário para a anestesia profunda, recuperação e sobrevivência dos juvenis de tilápia foram as concentrações dos anestésicos.

Tabela 1. Variáveis de qualidade de água no experimento realizado com diferentes concentrações de eugenol e benzocaina em tilápia, *Oreochromis niloticus*.

Anestésico	Temperatura (°C)		Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)		pH	
	Indução	Recuperação	Indução	Recuperação	Indução	Recuperação
40 mg L ⁻¹ Eugenol	23,1 ± 0,3	23,2 ± 0,2	7,5 ± 0,3	7,5 ± 0,1	7,7 ± 0,0	7,7 ± 0,1
60 mg L ⁻¹ Eugenol	23,1 ± 0,2	23,1 ± 0,6	7,3 ± 0,5	6,9 ± 0,3	7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,0
80 mg L ⁻¹ Eugenol	22,8 ± 0,5	22,9 ± 0,3	6,7 ± 0,3	7,1 ± 0,2	7,7 ± 0,0	7,7 ± 0,1
100 mg L ⁻¹ Eugenol	23,1 ± 0,1	22,9 ± 0,4	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,4	7,8 ± 0,1	7,7 ± 0,0
100 mg L ⁻¹ Benzocaina	23,2 ± 0,2	23,0 ± 0,7	6,9 ± 0,2	6,9 ± 0,3	7,7 ± 0,0	7,7 ± 0,1
120 mg L ⁻¹ Eugenol	22,7 ± 0,1	22,8 ± 0,2	7,5 ± 0,7	7,3 ± 0,5	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1

Tabela 2. Variáveis de qualidade de água no experimento realizado com diferentes concentrações de eugenol em anestésias sucessivas com tilápia, *Oreochromis niloticus*.

Anestésico	Temperatura (°C)		Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)		pH	
	Indução	Recuperação	Indução	Recuperação	Indução	Recuperação
60 mg L ⁻¹ Eugenol	22,8 ± 0,2	22,9 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,7 ± 0,0	7,7 ± 0,1
80 mg L ⁻¹ Eugenol	23,1 ± 0,5	23,1 ± 0,5	6,9 ± 0,5	7,0 ± 0,3	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1
100 mg L ⁻¹ Eugenol	23,2 ± 0,3	23,0 ± 0,3	7,2 ± 0,4	7,2 ± 0,2	7,8 ± 0,1	7,7 ± 0,0

Tabela 3. Variáveis de qualidade de água no experimento realizado com diferentes concentrações de eugenol em anestésias sucessivas com tilápia, *Oreochromis Niloticus* após 24 horas da primeira indução anestésica.

Anestésico	Temperatura (°C)		Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)		pH	
	Indução	Recuperação	Indução	Recuperação	Indução	Recuperação
60 mg L ⁻¹ Eugenol	23,1 ± 0,4	22,8 ± 0,5	7,3 ± 0,5	7,2 ± 0,4	7,5 ± 0,4	7,6 ± 0,3
80 mg L ⁻¹ Eugenol	22,9 ± 0,3	23,0 ± 0,4	7,1 ± 0,3	7,1 ± 0,5	7,7 ± 0,3	7,7 ± 0,2
100 mg L ⁻¹ Eugenol	23,2 ± 0,5	23,1 ± 0,3	6,9 ± 0,4	7,2 ± 0,2	7,5 ± 0,1	7,7 ± 0,1

1º ensaio: Determinação da concentração anestésica

Em todas as concentrações testadas os peixes foram induzidos à anestesia (estágio anestésico 3) (Tabela 4). As tilápias imersas nas soluções com benzocaína, no estágio anestésico 1, debateram-se violentamente antes de perder o equilíbrio (estágio 2). Em relação ao comportamento das tilápias submetidas à anestesia com eugenol, notou-se que estas não se debateram durante o processo de indução anestésico, corroborando com as observações de PEAKE (1998). Uma explicação plausível para esse fato é que, provavelmente, a benzocaína possui propriedades irritantes como o ácido p-aminobenzóico, deixando-os agitados durante o ensaio.

De acordo com a Tabela 4, pode-se observar que as concentrações de 100 e 120 mg L⁻¹ de eugenol e 100 mg L⁻¹ de benzocaína possibilitaram aos peixes alcançarem o estágio 1 mais rapidamente em relação às menores concentrações de eugenol. A concentração de 120 mg L⁻¹ de eugenol induziu os animais ao 2º estágio anestésico mais rapidamente somente na menor concentração, de 40 mg L⁻¹ de eugenol. Para atingir o estágio 3, as concentrações que apresentaram menores tempos de indução anestésica, foram 100 e 120 mg L⁻¹ de eugenol e 100 mg L⁻¹ de benzocaína, com tempos de 74,0 ± 18,0 segundos, 95,3 ± 31,7 segundos e 70,2 ± 13,4 segundos, respectivamente.

Tabela 4. Tempo (segundos) de indução e recuperação aos estágios de anestesia em juvenis de tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes concentrações de eugenol (40, 60, 80, 100, 120 mg L⁻¹) e benzocaína (100 mg L⁻¹).

Anestesia	Estágio 1 (s)	Estágio 2 (s)	Estágio 3 (s)	Recuperação (s)
40 mg L ⁻¹ Eugenol	28,3 ± 5,6 b	70,3 ± 19,3 b	198,8 ± 32,9 d	184,2 ± 92,8 a
60 mg L ⁻¹ Eugenol	34,7 ± 6,3 b	67,3 ± 15,4 ab	126,7 ± 21,7 c	214,7 ± 32,9 ab
80 mg L ⁻¹ Eugenol	32,2 ± 10,0 b	59,7 ± 11,6 ab	112,8 ± 12,3 bc	191,5 ± 38,2 ac
100 mg L ⁻¹ Eugenol	15,2 ± 4,2 a	46,2 ± 12,1 ab	74,0 ± 18,0 a	271,7 ± 48,3 ab
120 mg L ⁻¹ Eugenol	11,5 ± 4,5 a	39,5 ± 28,1 a	95,3 ± 31,7 ac	300,0 ± 52,5 b
100 mg L ⁻¹ Benzocaína	17,2 ± 3,9 a	52,8 ± 7,3 ab	70,2 ± 13,4 a	282,6 ± 52,3 bc

Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P<0,05).

No período de recuperação, os peixes testados que apresentaram menor tempo de recuperação anestésica foram as concentrações de 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹ de eugenol, diferindo apenas da maior concentração de eugenol 120 mg L⁻¹ e de 100 mg L⁻¹ de benzocaína.

De acordo com MARKING e MEYER (1985), a indução à anestésia profunda deve apresentar um curto tempo de latência (60 a 180 segundos), e a recuperação não deve ultrapassar 300 segundos. Neste trabalho, a exposição de juvenis de tilápia ao eugenol nas concentrações de 60 a 120 mg L⁻¹ e de benzocaína a 100 mg L⁻¹ estão dentro deste intervalo sendo, por isso, consideradas válidas para trabalhos de anestesia.

No entanto, com o intuito de se avaliar uma concentração de eugenol para a substituição da benzocaína, indica-se a concentração de 100 mg L⁻¹ de eugenol por apresentar baixo tempo de

indução e recuperação anestésica. As concentrações determinadas para a tilápia encontram-se dentro do intervalo de valores já obtidos para esta espécie (DELBON, 2006; VIDAL *et al.*, 2007) e para outras espécies como robalo (*Dicentrarchus labrax*), dourada (*Sparus aurata*) e lambari (*Astyanax altiparanae*) (MYLONAS *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

Nenhuma mortalidade foi observada durante o teste, demonstrando que os anestésicos testados apresentam grande margem de segurança.

Os modelos encontrados para a indução e recuperação dos peixes anestesiados com eugenol obedecem às equações $I = -1,2985x + 225,4$ e $R = 1,4430x + 116,98$, em que I é o tempo necessário para a indução (em segundos), R o tempo necessário para recuperação (em segundos) e x a concentração utilizada. Para a equação de indução, o R² foi 0,7477; na recuperação, o R²

foi 0,7991, em concentrações que foram de 40 à 120 mg L⁻¹ (Figuras 1 e 2).

A curva de regressão ajustada para o tempo de indução à anestesia profunda (Figura 1) indica redução linear no tempo de indução anestésica com a elevação da concentração. Isto também foi confirmado por SOTO e BURHANUDDIN (1995) que, ao induzirem exemplares de rabbitfish (*Siganus lineatus*) à anestesia com óleo de cravo em concentrações de 33, 50, 67 e 100 mg L⁻¹, relataram que a de 33 mg L⁻¹ correspondeu ao maior tempo de indução (150 a 190 s). Da mesma forma, CUNHA e ROSA (2006), estudando o mesmo anestésico em diferentes espécies de peixes

tropicais, também observaram que a menor concentração testada (20 mg L⁻¹) proporcionou o maior tempo de indução (127,33 s).

Além da redução linear no tempo de indução anestésica (Figura 1), observa-se, na Figura 2, aumento do tempo de recuperação com a elevação da concentração. De fato, quanto menor o tempo de indução à anestesia, maior é o tempo de recuperação dos peixes (PARK *et al.*, 2008).

WALSH e PEASE (2002), avaliando a eficácia do óleo de cravo como anestésicos em enguias (*Anguilla reinhardtii*), também observaram que o aumento na concentração do óleo de cravo durante a anestesia reduziu o tempo de indução.

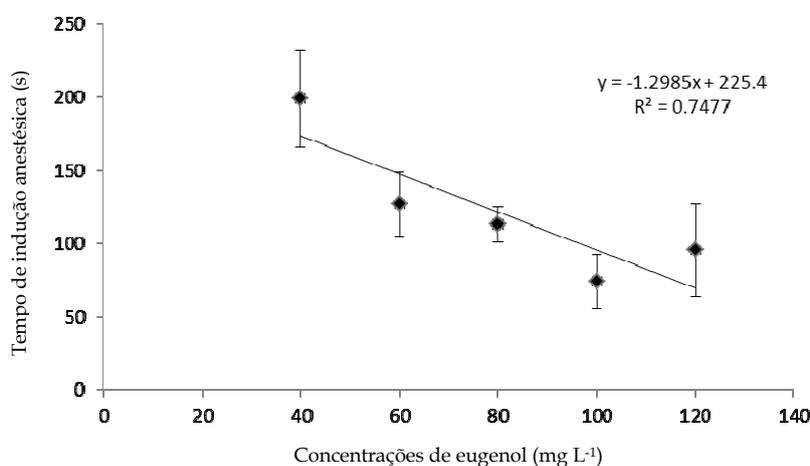


Figura 1. Curva de regressão ajustada para o tempo de indução anestésica em juvenis de tilápia, *Oreochromis niloticus*, submetidos a diferentes concentrações de eugenol.

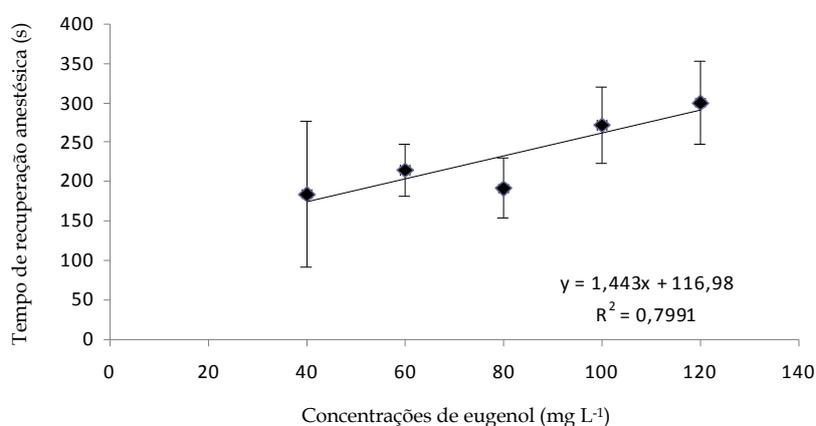


Figura 2. Curva de regressão ajustada para o tempo de recuperação ao estágio de anestesia profunda em juvenis de tilápia, *Oreochromis niloticus*, submetidos a diferentes concentrações de eugenol.

2º ensaio: Anestésias sucessivas (a cada 24 horas)

Ao final do 1º ensaio visando a determinação das melhores concentrações de eugenol (60, 80 e 100 mg L⁻¹), sendo a concentração ideal a de 100 mg L⁻¹, comparou-se a ação destas concentrações anestésicas sob os tempos de sedação, indução e

recuperação anestésica em duas anestésias consecutivas.

Em relação às concentrações testadas, houve diferença significativa ($P < 0,05$) apenas no tempo de sedação anestésica, como pode ser visto na Figura 3.

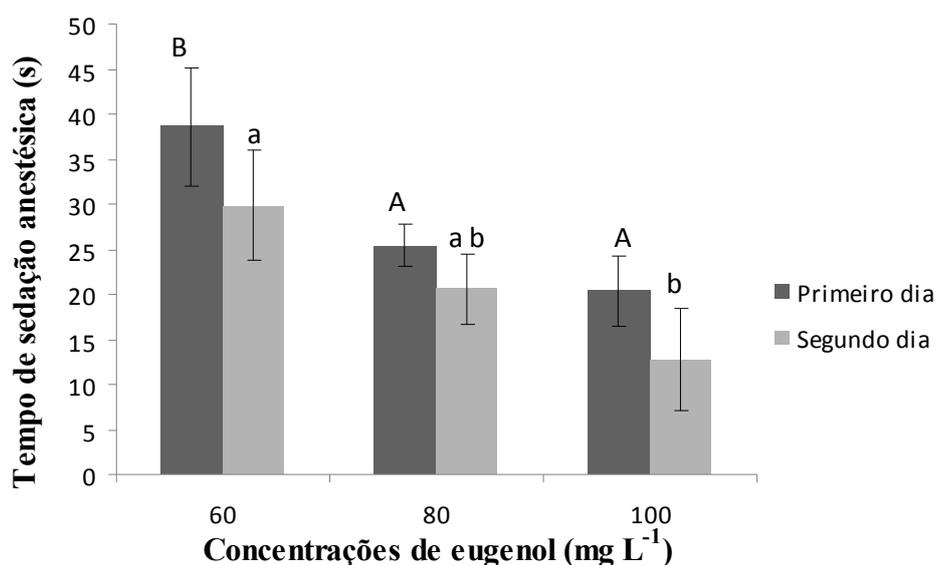


Figura 3. Comparação dos tempos de indução anestésica entre os dias consecutivos de anestesia (1º e 2º dias), nas concentrações testadas de eugenol. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$) no primeiro dia do ensaio. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$) no segundo dia do ensaio (após 24 horas).

Nenhuma mortalidade foi observada durante o teste. Avaliando-se o tempo de sedação anestésica, no primeiro dia de anestesia, notou-se que houve diferença significativa entre a menor concentração testada (60 mg L⁻¹) em relação as demais doses, apresentado maior tempo para atingir o estágio desejado. Ou seja, as menores concentrações de eugenol (no caso, 60 mg L⁻¹) tendem a aumentar os tempos de sedação e indução anestésica, corroborando com os resultados do experimento anterior e com SOTO e BURHANUDDIN (1995). No mesmo parâmetro analisado, no segundo dia, a diferença ocorreu na maior concentração (100 mg L⁻¹) em relação à 60 mg L⁻¹ (Figura 3).

Em relação aos tempos de indução e de recuperação anestésica, não houve diferença

significativa ($P > 0,05$) entre as concentrações testadas, tanto no primeiro quanto no segundo dia (Tabela 5).

INOUE *et al.* (2003) igualmente não observaram diferença estatística quanto ao tempo de indução para concentrações acima de 40 mg L⁻¹, em estudo com diferentes concentrações de óleo de cravo para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). TORT *et al.* (2002), por sua vez, verificaram que o tempo de indução foi semelhante para todas as concentrações de óleo de cravo testadas em dourada (*Sparus aurata*) e em truta (*Ocorhynchus mykiss*). Quanto ao tempo de recuperação, DELBON (2006), em estudo para avaliar a concentração ideal do óleo de cravo em juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), também não observou diferença estatística entre as concentrações de 40 a 100 mg L⁻¹.

Tabela 5. Tempo em segundos de indução (estágios 1, 2 e 3) e de recuperação anestésica avaliados em juvenis de tilapia, anestesiados por diferentes concentrações de eugenol, em dias sucessivos.

Concentração anestésica (mg L ⁻¹)	Estágio 1 (s) Sedação leve		Estágio 2 (s) Sedação profunda		Estágio 3 (s) Anestesia		Recuperação (s)	
	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia
60	38,6 ± 6,6	29,8 ± 6,1	64,8 ± 10,2	75,4 ± 13,8	98,4 ± 33,8	126,2 ± 54,7	179,8 ± 91,0	284,4 ± 112,8
80	25,4 ± 2,3	20,6 ± 3,9	57,9 ± 11,3	61,5 ± 25,3	83,4 ± 11,3	145,4 ± 35,9	175,2 ± 26,0	297,2 ± 29,6
100	20,4 ± 3,9	12,8 ± 5,7	48,3 ± 8,5	58,4 ± 21,8	71,8 ± 13,8	114,5 ± 12,5	297,0 ± 24,6	244,2 ± 45,6

O eugenol, principal componente do óleo de cravo, tem sido relatado como um anestésico alternativo para peixes (CHO e HEATH, 2000; WOODY *et al.*, 2002; INOUE *et al.*, 2003; ROUBACH *et al.*, 2005). Até o momento, em experimentos cromatográficos, não foram encontrados traços tóxicos deste produto em animais aquáticos após 24 horas de exposição ao produto (KILDEA *et al.*, 2004). Essa característica fez com que o AQUIS (forma comercial do eugenol) fosse liberado na aquicultura em países da Austrália e Nova Zelândia (ROSS e ROSS, 2008). O eugenol é um composto orgânico seguro e não mutagênico e totalmente eliminado da corrente sanguínea e do tecido muscular de peixes em menos de dois dias após o seu uso (SLADKY *et al.*, 2001; WOODY *et al.*, 2002; KILDEA *et al.*, 2004).

Neste trabalho, avaliando as diferenças nos parâmetros analisados entre os dias sucessivos, pode-se observar que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nas concentrações testadas (60, 80 e 100 mg L⁻¹), sugerindo que o anestésico eugenol é completamente eliminado do organismo do peixe em um período de até 24 horas, visto que não houve alteração, após anestesia sucessiva, nos tempos de sedação, indução e de recuperação anestésica. Assim, recomenda-se que um período de 24 horas é suficiente para eliminar qualquer resíduo anestésico de eugenol em *O. niloticus*, corroborando com a pesquisa de CHO e HEATH (2000), que avaliaram resíduos em *Oncorhynchus tshawytscha* (salmão-real). No entanto, o tempo de depuração é variável, dependendo da espécie estudada, visto que GUENETTE *et al.*, 2007 revelaram que a administração sucessiva de eugenol pode levar à acumulação do produto em *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a concentração que apresenta os menores tempos de indução e de recuperação anestésica é de 100 mg L⁻¹ de eugenol. Sugere-se que o resíduo anestésico do eugenol é eliminado do organismo do peixe em até 24 horas, visto que a anestesia sucessiva não compromete os tempos de indução e recuperação anestésica.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W.G.; MCKINLEY, R.S.; COLAVECCHIA, M. 1997 The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, Narragansett, 17: 301-307.
- BARTON, B.A. 2000 Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Fisheries Management*, Narragansett, 62(1): 12-18.
- BOOTH, N.H. 1988 Drug and chemical residues in the edible tissues of animals. In: BOOTH, N.H. e McDONALD, L.E. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6th ed. Iowa State University Press, Iowa, p.1149-1159.
- BOWSER, P.R. 2001 Anesthetic options for fish. In: GLEED, R.D. e LUDDERS, J.W. *Recent Advances in Veterinary and Analgesia: Companion animals*. International Veterinary Information Service, Ithaca, Nova York, p.223-241.
- CHANDROO, K.P.; DUNCAN, I.J.H.; MOCCIA, R.D. 2004 Can fish suffer?: Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, Vancouver, 86: 225-250.

- CHO, G.K. e HEATH, D.D. 2000 Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Watbaum). *Aquaculture Research*, Oxford, 31: 537-546.
- COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. 2004 *Anesthetics in aquaculture*. Texas: SRAC, 6p. (SRAC Publications, 3900).
- CUNHA, F.E.A. e ROSA, I.L. 2006 Anesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. *Journal of Fish Biology*, Scotland, 69: 1504-1512.
- DELBON, M.C. 2006 *Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, Oreochromis niloticus*. Jaboticabal. 87p. (Dissertação de mestrado em Aquicultura. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP). Disponível em: <www.caunesp.unesp.br>
- DUNLOP, R. e LAMING, P. 2005 Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Pain*, Seattle, 6(9): 561-568.
- GOMES, L.C.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R. 2001 Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 32: 426-431.
- GUENETTE, S.A.; UHLAND, F.C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. 2007 Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Amsterdam, 266(1-4): 262-265.
- INOUE, L.A.K.A.; NETO, C.S.; MORAES, G. 2003 Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, Santa Maria, 33(5): 943-947.
- IWANA, G. e ACKERMAN, A. 1994 Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P. e MOMMSEN, T. P. *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, 3(1): 1-5.
- KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO, C.G. 1998 The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, Oxford, 29: 89-101.
- KILDEA, M.A.; ALLAN, G.L.; HEARNEY, R.E. 2004 Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-STTM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, Amsterdam, 232: 265-277.
- MARKING, L.L. e MEYER, F.P. 1985 Are better anesthetics needed in fisheries. *Fisheries*, 10(6): 2-5.
- MARTINS, M.L. 2004 Manejo sanitário na piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.P. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Livraria Varela. pt. IV, cap. 15, p.323-332.
- MAZZAFERA, P. 2003 Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 26: 231-238.
- MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. 2005 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*, Amsterdam, 246: 467-481.
- PARK, M.O.; HUR, W.J.; IM, S.Y.; SEOL, D.W.; LEE, J.; PARK, I.S. 2008 Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research*, Oxford, 39: 877-884.
- PEAKE, S. 1998 Sodium bicarbonate and clove oil as potential anesthetics for nonsalmonid fishes. *North American Journal of Fisheries Management*, Narragansett, 18: 919-924.
- ROSS, L.G. e ROSS, B. 1999 *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*, 2nd ed. Blackwell, London, UK. 159p.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. 2008 *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 240p.
- ROUBACH, R. e GOMES, L.C. 2001 O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, 11(66): 37-40.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; LOURENÇO, J.N.P.; FONSECA, F.A.L.; SANTOS, P.J.O.; VAL, A.L.

- 2001 Efficacy of eugenol as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. International Congress on biology of fishes. *Tropical fish: news and news*, Vancouver, p.93-96.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. 2005 Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, Oxford, 36(11): 1056-1061.
- SLADKY, K.K.; SWANSON, C.R.; STOSKOPF, M.K.; LOOMIS, M.R.; LEWBART, G.A. 2001 Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, 62(3): 337-342.
- SILVA, E.M.P.; OLIVEIRA, R.H.F.; RIBEIRO, M.A.R.; COPPOLA, M.P. 2009 Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. *Ciência Rural*, Santa Maria, 39(6): 1851-1856.
- SNEDDON, L.U. 2003 The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*, Vancouver, 83: 153-162.
- SOTO, C. e BURHANUDDIN, G. 1995 Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, Amsterdam, 136: 149-152.
- STONE, D. e TOSTIN, N. 1999 Clove bud oil a big yawn for silver perch. *Fisherie NSW Maganize Spring*, Sydney, 19: 30-34.
- SUMMERFELT, R.C. e SMITH, L.S. 1990 Anaesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C.B. e MOYLE, P.B. *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD. p.213-272.
- TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. 2002 Cortisol e haematological response in sea bream and trout subjected to anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Research*, Oxford, 33: 907-910.
- TYTLER, P. e HAWKINS, A.D. 1981 Vivisection, anaesthetics and minor surgery. In: HAWKINS, A.D. *Aquarium Systems*. Academic Press, New York, NY. p.247-278.
- VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; SANTOS NETO, E.B.; DEUS, B.T.; ALBINATI, A.C.L. 2007 Influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) à ação anestésica do eugenol. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, 8(3): 212-216.
- VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. 2008 Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 43(8): 1069-1074.
- WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. 2002 Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, Amsterdam, 211: 353-366.
- WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. 2002 Clove oil as an anaesthetic for adultsockeye salmon: field trails. *Journal of Fish Biology*, Scotland, 60: 340-347.
- WALSH, C.T. e PEASE, B.C. 2002 The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquaculture Research*, Oxford, 33: 627-635.
- ZAR, J.H. 1996 *Biostatistical Analysis*. 3rd Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA. 662p.