

PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM ECOLOGIA E PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL

RAFAEL ALVES DE FREITAS

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS PUROS E MISTO DE ÓLEO DE CRAVO E
MELALEUCA, NA SEDAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).

Goiânia
2015

RAFAEL ALVES DE FREITAS

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS PUROS E MISTO DE ÓLEO DE CRAVO E
MELALEUCA, NA SEDAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Ecologia e Produção
Sustentável da Pontifícia Universidade
Católica de Goiás como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Breno de Faria e Vasconcelos

Goiânia - GO

2015

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Freitas, Rafael Alves de.

F866a Avaliação de compostos puros e misto de óleo de cravo e melaleuca, na sedação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) [manuscrito] / Rafael Alves de Freitas – Goiânia, 2015.
84 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Strito Senso* em Ecologia e Produção Sustentável, 2015.

“Orientador: Prof. Dr. Breno de Faria e Vasconcelos”.

Bibliografia.

1. Óleo de Melaleuca. 2. Cravo-da-índia. 3. Tilápia (Peixe). I.
Título.

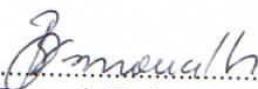
CDU 639.3(043)

RAFAEL ALVES DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DO USO DE COMPOSTO MISTO DE ÓLEO DE CRAVO E ÓLEO
DE MELALEUCA PURO, NA SEDAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DEFENDIDA E APROVADA EM 24 DE FEVEREIRO DE 2015

BANCA EXAMINADORA



.....
Prof. Dr. Breno de Faria e Vasconcellos / PUC Goiás
(presidente-orientador)



.....
Prof. Dr. Fabrício Pereira Resende / EMBRAPA/ TO
(avaliador externo)



.....
Prof. Dr. Roberto Toledo de Magalhães / PUC Goiás
(avaliador interno)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho, Rafael Alves de Oliveira Freitas, pelos momentos de alegria.

A minha mãe, Varcenira Alves de Freitas, por ter me ensinado valores que contribuíram para minha formação.

A minha namorada, Maranusa Cavalcante Lelis, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e contribuição nos momentos difíceis.

A todos que estiveram sempre presentes, dividindo comigo as angústias, decepções, incertezas e conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo Dom da Vida e pela oportunidade de ter encontrado em meu caminho pessoas a serem lembradas eternamente e por conceder-me força e serenidade para concluir este trabalho.

Ao meu orientador – Prof. Dr. Breno de Faria e Vasconcelos pela paciência e disposição em me atender nos momentos de dificuldade.

Aos demais professores pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas de curso pelos momentos de descontração proporcionados após as aulas.

À todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

EPIGRAFE

“Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais: os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento.”

Charles Darwin

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar as alterações dos parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em função da sedação com diferentes combinações de óleo de cravo e melaleuca. Foram utilizados 230 peixes com $66 \text{ g} \pm 18,56 \text{ g}$, submetidos a soluções de óleo de cravo com 0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% de óleo de melaleuca, a uma concentração de 100 mg/L, totalizando 6 tratamentos e o grupo controle. Assim, foram utilizados 20 baldes plásticos transparentes de 1,5 litros, e 6 aquários de 10 litros, onde os peixes foram individualizados para observação dos tempos de sedação e recuperação. No momento em que os peixes alcançaram o estágio 5 de sedação, foram selecionados para coleta de sangue, que se repetiu 1 hora e 24 horas após a sedação, com 10 peixes a cada coleta. A análise do pH, oxigênio dissolvido, amônia da água e biometria dos peixes ocorreu antes da sedação, e no momento de cada coleta de sangue. Os resultados mostraram que as soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca influenciaram nos parâmetros hematológicos, no tempo de sedação e no comportamento dos peixes. Pode-se concluir que o óleo de melaleuca é apropriado para sedação de tilápia do Nilo. Paralelamente conclui-se que o óleo de melaleuca pode ser usado em associação com óleo de cravo com o objetivo de amenizar os efeitos negativos causados pelo óleo de cravo puro.

Palavras-chave: óleo de melaleuca, óleo de cravo, tilápia, transporte, estresse.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the changes in hematological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) according to sedation due to different tea tree oil and clove combinations. 230 fish were used with $66 \text{ g} \pm 18.56 \text{ g}$, clove oil submitted to solutions containing 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% tea tree oil. at a concentration of 100 mg / L, a total of 6 treatments and the control group. So, we used 20 transparent plastic buckets 1.5 liter, 6 and 10 liter aquariums. Where the fish were individualized for observation of sedation and recovery times, at the time the fish reached stage 5 sedation, were selected for blood collection, that repeated 1 hour and 24 hours after sedation, with 10 fish every collect. The analysis of pH, dissolved oxygen, ammonia water and fish biometrics occurred before sedation, and at the time of each blood collect. The results showed that the clove oil, and tea tree oil solutions influence on hematological parameters, in the time sedation and fish behavior. It can be concluded that the tea tree oil is suitable for sedation Nile tilapia. At the same time it is concluded that the tea tree oil can be used in conjunction with clove oil with the objective of mitigating the negative effects caused by pure clove oil

Keywords: tea tree oil, clove oil, tilapia, transportation, stress.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	11
1.2 Transporte e Estresse.....	12
1.3 Anestesia.....	17
1.4 Óleo de Cravo - da - Índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>).....	23
1.5 Óleo de Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	25
2 OBJETIVO	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.1.1 Objetivo Específico.....	27
3 MATERIAS E MÉTODOS	28
3.1 Local e Animais.....	28
3.2 Delineamento Experimental.....	29
3.3 Condução do Experimento.....	31
3.3.1 Anestesia.....	32
3.3.2 Recuperação.....	33
3.4 Coletas de sangue e análise dos parâmetros hematológicos.....	34
3.5 Análise Estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Parâmetros da água.....	37
4.1.1 Temperatura.....	37
4.1.2 Potencial de hidrogênio (p H)	38
4.1.3 Amônia.....	39
4.1.4 Oxigênio dissolvido (OD)	43
4.1.5 Parâmetros hematológicos.....	44
4.1.6 Correlação dos parâmetros hematológicos.....	59
4.2 Indução à anestesia.....	60
4.3 Recuperação.....	64
4.3.1 Correlação entre as fases de sedação e fases de recuperação.....	67
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	71

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a quinta posição na produção de tilápia, e é responsável por 6 % do total da produção mundial (FAO, 2012). O cultivo de tilápias vem crescendo de forma expressiva (OSTRENSKY, *et al.*, 2008). O desenvolvimento da tilapicultura tem resultado na intensificação dos esforços para o manejo profissional em todas as etapas da cadeia produtiva. Esse interesse parte dos piscicultores, que buscam linhagens de desempenho superior, formas de transporte, e um manejo adequado dos juvenis (OLIVEIRA, 2007).

A rotina na piscicultura é composta por uma série de práticas de manejo tais como: biometria, transporte e reprodução induzida. Essas práticas estressam facilmente os peixes. O estresse é responsável por uma série de efeitos negativos na produção, o que vem chamando a atenção e causando preocupação entre os produtores (URBINATI; CARNEIRO, 2005).

No intuito de se evitar efeitos negativos na produção causados pelo estresse, o uso de anestésicos tem se tornado cada vez mais comum em pisciculturas e nos procedimentos de pesquisa. Entretanto, o efeito dos anestésicos vem sendo discutido e ainda não existe um consenso em relação ao emprego de termos técnicos, como sedação, anestesia e narcose, que muitas vezes dão origem a controvérsias entre os pesquisadores (HEAVNER, 1981).

Além das controvérsias devido ao emprego de termos técnicos, existem questões como a adequação das substâncias para sedação e o quanto são seguras para os peixes e humanos. Peixes expostos a Tricaína Metano Sulfonato (MS 222), óleo de cravo, metomidato, benzocaína, gás carbônico e fenoxietanol apresentam respostas aos anestésicos que vão além dos efeitos característicos da sedação. Essas respostas vão desde a perda da coloração, tosse, reflexo de regurgitação à hiperventilação. (TORT *et al.*, 2002; IVERSEN *et al.*, 2003; PIRHONEN e SCHRECK, 2003; WAGNER *et al.*, 2003).

No intuito de minimizar o estresse causado pelo transporte e pelos anestésicos, a busca por compostos naturais menos residuais e menos agressivos vem aumentando. Dentre os compostos de fontes naturais usados como anestésicos na piscicultura, destacam-se, o óleo de cravo, substância fenólica obtida da destilação

das folhas, caule e flores do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), que apresenta, na sua composição 70 e 95% do princípio ativo de eugenol (MAZZAFERA, 2003), e, também o óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), extraído das folhas da árvore de chá, que pode conter quantidades variadas de terpenos (pineno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol (ALTMAN, 1989).

Embora o óleo de cravo seja muito utilizado na piscicultura como anestésico, ainda são necessários estudos visando a elaboração de protocolos mais eficientes para diferentes espécies. Os estudos voltados ao uso do óleo de melaleuca para sedação de peixes ainda são escassos. Hajek, (2011) afirma que o óleo de melaleuca atende aos requisitos de um bom anestésico, porém em um trabalho de sedação realizado com carpa comum (*Cyprinus carpio*), observou-se que a sua potencia é inferior a outros fármacos utilizados como anestésico.

Neste trabalho, propõe-se a realização de testes com compostos mistos de óleo de cravo e óleo de melaleuca puro na sedação de juvenis de tilápia, visando avaliar os efeitos das diferentes proporções de anestésicos sobre o tempo de sedação, comportamento, e parâmetros, hematológicos, avaliados antes, durante e após a sedação.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie tropical originária da África que se desenvolve em uma temperatura que varia entre 25 e 30°C, tendo seu crescimento afetado em temperaturas abaixo de 15°C e não resistindo a temperaturas por volta de 9°C (ONO e KUBITZA, 2003; LIKOGWE *et al.*, 1996, CYRINO e CONTE, 2006). Segundo Watanabe *et al.*, (2002), esta é a terceira espécie de maior importância econômica na aquicultura mundial. Para Pinheiro *et al.*, (2006), a tilapicultura é uma importante atividade agroindustrial capaz de gerar grande retorno financeiro para os produtores.

As tilápias foram introduzidas no Brasil em 1971, devido à ação do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS). Estes animais foram introduzidos primeiramente nos açudes do Nordeste, e de lá se difundiram para todo o país (NOGUEIRA, 2003). No começo do século XIX tiveram início as pesquisas para sua criação de tilápias no Congo Belga (atual Zaire). A partir de 1924, sua criação foi intensificada no Quênia, e sua expansão para outras partes do mundo se deu a partir da Malásia (CAMPO, 2008).

Segundo Zimmermann (2000), atualmente estão disponíveis no mercado diversas linhagens de tilápia com um bom desempenho zootécnico, sendo que uma das linhagens mais procuradas no mercado brasileiro é a linhagem chitralada também conhecida como tailandesa. Esta linhagem foi desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio Real de Chitralada, na Tailândia. A tilápia do Nilo é a espécie que mais se destaca na piscicultura mundial, por apresentar rusticidade, alto ganho de peso, facilidade de reprodução, excelente sabor da carne e tempo curto para atingir o tamanho comercial (KUBITZA, 2000).

A produção da tilápia do Nilo no Brasil, em 2011, alcançou 253.824 toneladas, representando 47% dos peixes cultivados no país (MPA, 2011). Segundo os dados da FAO (2011), sendo a tilápia do Nilo uma das espécies mais importante para a aquicultura mundial, é também a espécie mais cultivada na piscicultura brasileira.

O rápido crescimento na produção da tilápia pelo mundo é atribuído ao fato de este ser um dos peixes com maior potencial para a aquicultura. Esse potencial é facilmente percebido por características como rápido crescimento, alimentação variada, boa adaptação em diferentes ambientes e sistemas de produção, resistência a doenças, densidades de estocagem elevadas e baixos teores de oxigênio dissolvido, (ONO e KUBITZA, 2003; ZIMMERMANN e FITZSIMMONS, 2004; CYRINO e CONTE, 2006). Quando criada em sistema de tanque rede ou viveiro a tilápia nilótica pode alcançar até 800 g em seis meses (CAMPOS *et al.*, 2007).

Embora a tilápia do Nilo seja de fácil criação, a principal característica responsável pelo aumento de sua produção é a qualidade de sua carne. A tilápia do Nilo apresenta carne com um bom valor nutricional, boas características organolépticas, com baixo teor de gordura (0,9 g/100g de carne) e de calorias (117 kcal/100g de carne), rendimento de filé de 35 a 40% e ausência de espinhos em forma de “Y” (mioceptos), tornando-a apropriada para industrialização, possuindo elevado valor comercial principalmente nos países desenvolvidos (SOUZA e MARANHÃO, 2001; ONO e KUBITZA, 2003; ZIMMERMANN e FITZSIMMONS, 2004; CYRINO e CONTE, 2006).

1.2 TRANSPORTE E ESTRESSE

O transporte de peixes vivos é uma prática rotineira que abrange desde as atividades de produção de modo geral até as práticas de pesquisa (PIPER *et al.*, 1982; KUBITZA, 1997; CARMICHEL *et al.*, 2001). Esta prática é inevitável nos sistemas de produção, mesmo sendo um procedimento traumático que expõe os peixes a uma série de estímulos responsáveis por desencadear respostas fisiológicas de adaptação (IVERSEN *et al.*, 1998; URBINATI e CARNEIRO, 2004).

Segundo Kubitza (1997) e Grottum *et al.* (1997), o objetivo básico do transporte de peixes é carregar de forma segura a maior densidade possível de animais no menor volume de água. No transporte em si, o adensamento resulta em abrasão mecânica devido ao contato entre os peixes (ROSS e ROSS, 1999; GOMES *et al.*, 2003a).

Kubitza (1997) destaca que as formas tradicionais de transporte se limitam ao

uso de tanques ou sacos plásticos, o primeiro podendo ser ou não oxigenado. O autor ainda ressalta que as cargas de peixes podem ser afetadas por fatores como: tempo de transporte, temperatura da água, tamanho dos peixes, jejum antes do transporte, uso de anestésicos e a espécie de peixe em questão. Quando estes fatores não são considerados, o transporte tende a ser realizado de maneira inadequada, o que gera consequências indesejáveis aos animais, como mortalidade em massa ou doenças (INOUE e MORAES, 2006).

Embora haja vários avanços nas técnicas de manejo adotadas no transporte, ainda podem-se registrar perdas consideráveis no caso de diferentes espécies em diferentes estágios. As espécies apresentam diferentes graus de tolerância para as condições de transporte, o que torna necessário um estudo mais detalhado sobre o manejo de cada espécie. Segundo Kubitzka (1998), o transporte é realizado principalmente na fase mais sensível do desenvolvimento dos peixes que consiste nos estágios de larva, pós-larva e alevino, quando a mortalidade oscila entre 40 a 80%.

O transporte de peixes vivos pode ter um alto custo para os produtores. Os produtores que contam com estruturas de transporte de peixes vivos vendem diretamente a lojas e pesque-pagues por um melhor preço. Os produtores que não se encontram próximos a estes estabelecimentos enfrentam problemas como o aumento dos custos e dos riscos do transporte. As perdas durante o transporte muitas vezes oneram ainda mais a matéria prima final. Este fator, associado aos gastos com o transporte desestimulam os produtores, uma vez que o preço final tende a se aproximar do custo de produção (Kubitzka, 2007).

O transporte é uma atividade estressante para os peixes devido à ocorrência de uma sucessão de estímulos adversos, incluindo a captura, o carregamento das unidades de transporte, o descarregamento e a estocagem dos animais nos viveiros (ROBERTSON *et al.*, 1988). Durante o transporte, o tempo é um fator determinante uma vez que os peixes tendem a refletir a severidade e a duração do estressor (BARTON, 1997).

Em resposta ao estresse, surgem alterações hormonais, metabólicas, iônicas e hematológicas. Essas alterações já foram observadas em espécies como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pirarucu (*Arapaima gigas*), a matrinxã (*Brycon amazonicus*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o pintado (*Pseudoplatystoma*

corruscans) e o jundiá (*Rhamdia quelen*), submetidas ao transporte (GOMES *et al.*, 2003; 2006; URBINATI; CARNEIRO, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2006; FAGUNDES e URBINATI, 2008; CARNEIRO *et al.*, 2009).

Segundo Staurnes *et al.*, (1994), a captura pode gerar um estresse mais intenso que o próprio transporte. Para Clearwater e Pankhurst, (1997), a captura é considerada uma das etapas mais agressivas do manejo, por possuir um caráter agudo e severo. Assim como no transporte, a captura compreende uma série de estímulos dos quais se pode citar: perseguição, natação forçada do animal, exposição do peixe ao ar e abrasão do seu corpo com a rede e outros peixes (HOSHIBA, GONÇALVES E URBINATI, 2009).

Tanto o exercício físico da fuga, como a hipóxia resultante da retirada do peixe da água e os danos na superfície do corpo são estressores isolados e sucessivos que levam a uma resposta de estresse acumulativa. Até mesmo a captura com puçás em condições de laboratório, assim como o uso de redes em viveiros de criação, provocam a fuga dos peixes e natação forçada e extenuante (ARENDS *et al.*, 1999; ROSS e ROSS 1999; MILLIGAN *et al.*, 2000; SCHRECK, 2000; HOSHIBA, GONÇALVES e URBINATI, 2009).

Durante o carregamento e o transporte, inevitavelmente temos o manuseio direto dos peixes. Essa prática é conhecida por romper o equilíbrio dos animais com o ambiente de cultivo (homeostase), o que inicia uma série de respostas metabólicas típicas ao estresse (INOWE *et al.*, 2011). Devido a estas características, o manejo direto é tido como agente estressor agudo e, quando ocorre em intensidade e duração excessiva, pode resultar em manifestação de doenças em toda a população e, conseqüentemente, na morte dos animais (IWAMA *et al.*, 2004).

Até mesmo práticas de manejo rotineiras, como transferência de peixes de viveiros, biometria, análise patológica, seleção e manejo da reprodução artificial, são estressores isolados que provocam respostas de estresse semelhantes, tendo o potencial de afetar o desempenho do animal (SELYE, 1950; BARTON, 2000). No entanto, ainda existem diversos estudos que demonstram que os peixes podem sentir dor e medo, com possíveis alterações metabólicas (SNEDDON, 2003; CHANDROO *et al.*, 2004; DUNLOP e LAMING, 2005).

Segundo Inowe *et al.*, (2011) o estresse é o conjunto das reações metabólicas em resposta a um ou mais estímulos adversos do ambiente ou imposto pelo produtor

rural com fins de operacionalização dos sistemas de produção. Conseqüentemente, as reações fisiológicas dos peixes ao estresse agudo precisam ser mais bem estudadas, tanto em relação ao tipo de resposta como à sua intensidade (KRIEGER-AZOLINI *et al.*, 1989).

Para Kubitzka (1997), o estresse pode ser caracterizado em três tipos distintos: “estresse mecânico ou físico” resultante de injúrias físicas causadas durante a captura, confinamento para depuração, pesagem, carregamento e descarregamento dos peixes transportados, “estresse fisiológico” que diz respeito às alterações nos processos metabólicos, osmorregulatórios, inflamatórios e imunológicos dos peixes, e “estresse químico” que pode ser induzido por alteração nas propriedades químicas da água durante o transporte (queda do pH, por exemplo) ou pela adição de produtos químicos à água de transporte.

As respostas dos peixes ao estresse também podem ser divididas em três categorias distintas: primária, secundária e terciária (Barton e Iwama, 1991; Barton, 1997; Barton *et al.*, 2002).

Segundo Wendelaar Bonga (1997), as respostas primárias são respostas hormonais caracterizadas pela liberação de catecolaminas e cortisol para a circulação. São frutos da ativação de dois grandes sistemas: o eixo hipotalâmico-pituitário-interrenal (HPI) e o sistema simpático-cromafim (SC).

As respostas secundárias são resultado da ação dos hormônios liberados, que consistem em alterações na glicemia, na concentração plasmática de íons e nos parâmetros hematológicos, pois o cortisol possui ação hiperglicemiante, hiposmótica e imunossupressora (WENDELAAR BONGA, 1997). As respostas terciárias ocorrem por períodos prolongados de estresse e são representadas por exaustão física, comprometimento do crescimento e da reprodução, mudanças no comportamento, perda de função, e imunossupressão com maior ocorrência de doenças (WENDELAAR BONGA, 1997).

Existem vários trabalhos que apontam o cortisol como um importante indicador de estresse. Mommsen *et al.*, (1999), afirmam que o principal corticosteroide encontrado em peixes é o cortisol, sendo um bom indicador para avaliação de estresse primário. A liberação do cortisol no organismo do animal provoca o aumento no fluxo sanguíneo e na permeabilidade das membranas celulares e brânquias, o que facilita o transporte de oxigênio para atender à demanda biológica

dos tecidos e, ao mesmo tempo, acentua as perdas de sais do sangue para a água. Entretanto, a mudança da permeabilidade branquial leva à perda de eletrólitos sanguíneos, causando distúrbios osmorregulatórios nos peixes de água doce. Isso pode resultar em significativa mortalidade durante e, comumente, algumas semanas após o transporte (KUBITZA, 2007; McDONALD e MILLIGAN, 1997).

Outro bom indicador para resposta secundária é a glicose do sangue ou plasma, pois o seu nível pode ser medido com o uso de aferidor de glicose de fácil utilização e disponibilidade no mercado, podendo ser avaliada durante o manejo (WELLS e PANKHURST, 1999). A hiperglicemia é uma das respostas secundárias mais utilizadas para quantificação de estresse em peixes. A mobilização da glicose fornece energia extra ao animal, dando-lhe condições para superar as adversidades impostas (BARTON e IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997; McDONALD e MILLIGAN, 1997).

As alterações hematológicas também são usadas como resposta secundária a eventos estressantes para diversas espécies (BARTON E IWAMA, 1991; MORGAN E IWAMA, 1997). As alterações no hematócrito, no número de eritrócitos e na concentração de hemoglobina resultam da hemoconcentração ou hemodiluição, causada pelos distúrbios osmorregulatórios (HOUSTON, 1996). Segundo Tavares e Morais, (2004), os peixes submetidos a estresse apresentam alterações hematológicas, geralmente acompanhadas de hiperglicemia que ocorre devido à liberação de cortisol e outros hormônios, principalmente catecolaminas (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Existem literaturas referentes ao uso do cortisol como indicador de estresse, o que permite uma fácil comparação entre resultados diferentes (BRANDÃO, GOMES e CHAGAS, 2006), mas, para uma melhor compreensão das condições fisiológicas dos peixes frente a uma situação de estresse, aconselha-se uma análise do cortisol em conjunto com a glicose (CHAGAS *et al.*, 2012). Embora sejam de grande importância, as análises dos níveis de cortisol às vezes se mostram inviáveis devido à dificuldade em se conseguir os reagentes necessários, ou um laboratório equipado adequadamente.

Devido às limitações para análise do cortisol, recorre-se à análise dos níveis da glicose, e das respostas hematológicas como já vem sendo demonstrados em trabalhos como Tavares-Dias e *al.*, (2002), Façanha e Gomes (2005), Delbon

(2010), Inoue *et al* (2011), Cunha (2011). A preocupação com os efeitos do estresse no cultivo de espécies nativas resultou em pesquisas com o matrinxã, *Brycon cephalus* (CARNEIRO E URBINATI, 2001; 2002; CARNEIRO *et al.*, 2002a; IDE *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2004; URBINATI *et al.*, 2004), o jundiá, *Rhamdia quelen* (BARCELLOS *et al.*, 2001; 2003; 2004), o tambaqui, *Colossoma macropomun* (AFFONSO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2003a; 2003c; ; GOMES *et al.*, 2006) o pirarucu, *Arapaima gigas* (GOMES *et al.*, 2003b) e o pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (FAGUNDES e URBINATI, 2008).

Conforme esses autores, o aumento do hematócrito e do número de células vermelhas pode indicar uma alta demanda do estresse por oxigênio. Já o aumento de volume pode representar alterações eletrolíticas e influxo de água na célula (MCDONALD E MILLIGAN, 1997).

1.3 ANESTESIA

Os anestésicos podem conduzir os peixes a um estado de perda parcial ou completa da percepção dos estímulos externos e, conseqüentemente, comprometer a capacidade de reestabelecimento da postura normal de nado na coluna de água (SUMMERFELT e SMITH, 1990; IWAMA e ACKERMAN, 1994). Os anestésicos são importantes nas práticas rotineiras e na pesquisa, pois o seu uso facilita o manejo e possivelmente, reduz o estresse em animais terrestres e aquáticos (BOLASINA, 2006; SMALL, 2003 e 2004).

Vários fármacos conhecidos são destinados à anestesia de peixes. Segundo Bastos-Ramos, Gonçalves e Bacila (1998), os diversos anestésicos comumente utilizados na sedação de peixes são: MS-222, quinaldina, benzocaína, 2-phenoxiethanol, clobutanol, etomidato, metomidato, dióxido de carbono, nicotina, halotano, eugenol, thiopental, bicarbonato de sódio e eletronnarose, entre outros. Entretanto, mesmo havendo uma grande variedade de fármacos, o único anestésico aprovado pelo “Food and Drug Administration” (FDA) é o MS-222 (GOMES *et al.*, 2001) e, de acordo com ROUBACH *et al.* (2001), essa substância química é tóxica para os animais e para o homem.

No Brasil, com a resolução 714, de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária que autoriza a eutanásia de peixes com o uso de barbitúricos,

anestésicos inaláveis, CO₂, triclaína metano sulfonato (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína e 2-fenoxietanol, ainda há a preocupação com a aplicação dessas substâncias (BITTENCOURT *et al.*, 2012). Gomes *et al.* (2001), relatam a ausência de uma legislação no Brasil sobre a utilização de anestésicos em peixes destinados ao consumo humano. Nos Estados Unidos há regulamentação para o uso do MS-222 e benzocaína e na Nova Zelândia, para o uso do Aqui-S e MS-222. Os dois países determinam normas que especificam tempos de depuração para estes anestésicos, com exceção da benzocaína, para qual não é especificado o período.

Como não existem leis que regulamentam o uso de anestésicos para peixes no Brasil, procura-se seguir as recomendações da Food and Drug Administration (FDA). Porém, a MS222 não é produzida no Brasil e seu preço é demasiadamente alto, sendo necessário o uso de concentração dez vezes mais alta que uma concentração similar de benzocaína (GOMES *et al.*, 2001). Logo, o produtor se vê obrigado a recorrer à benzocaína como um substituto, o que a torna o anestésico mais utilizado para peixe no país (GOMES *et al.*, 2001, INOUE *et al.*, 2002)..

A benzocaína atende à maioria dos critérios estabelecidos por ROSS e ROSS (1999), pois é eficaz e possui boa margem de segurança para o homem e o peixe, tem custo baixo e é relativamente fácil de ser encontrada no mercado. Entretanto o uso de anestésicos como MS-222, quanaidina, benzocaína e phenoxiethanol podem causar efeitos colaterais como perda de muco, irritação de brânquias e olhos (INOUE; NETTO e MORAES, 2003). Vale resaltar que a benzocaína e o MS-222 são derivados do ácido paminobenzóico (TYTLER e HAWKINS, 1981), e os peixes submetidos a essas drogas necessitam de 21 dias para depuração, antes de serem destinados ao consumo humano (ROSS e ROSS, 1999).

Ross e Ross, (2000) afirmam que a escolha do anestésico muitas vezes se baseia em fatores como preço, disponibilidade e eficiência da droga. A eficiência da droga esta relacionada com tempo de indução e recuperação. O tempo de indução deve ser inferior a três minutos, e o tempo de recuperação, inferior a cinco minutos. O anestésico deve apresentar facilidade na utilização, baixos riscos para os animais e o homem, dosagens com uma ampla margem de segurança, ser de rápido metabolismo e excreção, ausência de efeitos persistentes nos peixes, e ausência de complicações posteriores para os animais (KEENE *et al.*, 1998; OKAMURA *et al.*, 2010; SYLVESTER, 1975).

A eficácia de um anestésico pode ser influenciada por fatores como a dosagem ministrada. As características dos peixes, como espécie, idade, tamanho, e sexo, e também fatores ambientais tais como salinidade, pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água também afetam a eficácia da droga (KING *et al.*, 2005; ROUBACH e GOMES, 2001; PARK *et al.*, 2008; ZAHL *et al.*, 2009). Essa influência foi discutida por autores como Zahl *et al.*, (2011) e Ross e Ross (2008).

Esses autores relatam a relação inversa entre o peso, tamanho e a taxa de metabolismo basal. Desta forma peixes menores e mais ativos exigem concentrações inferiores quando comparados a espécimes maiores. Roubach e Gomes, (2001) ressaltam a quantidade de gordura armazenada e a relação peso corpóreo/área da superfície branquial como fatores diretamente relacionados à concentração anestésica exigida (HOSKNEN e PIRHONEN, 2004; TSANTILAS *et al.*, 2006, ZAHL *et al.*, 2009 e 2011).

Além disso, animais da mesma espécie, porém, de tamanho diferente também exigirão tempos distintos para alcançarem determinado estágio de sedação. Logo uma concentração de anestésicos considerada ideal para uma espécie, quando ministrada para outra espécie pode levar a resultados perigosos (TSANTILAS *et al.*, 2006). Portanto, a determinação de dosagens recomendadas para cada espécie, e classe de tamanho é fundamental para procedimentos seguros durante a utilização de uma substância anestésica.

A anestesia pode ser injetada no subcutâneo ou no músculo do animal, mas a metodologia usual para anestésias em peixes é a imersão em solução anestésica que é absorvida pelas brânquias, principal rota de absorção e eliminação do fármaco, difunde-se para o sangue de onde é conduzida para o sistema nervoso central (MARKING e MEYER, 1985; ROSS e ROSS, 2008). O tempo de indução e recuperação da anestesia é influenciado pela taxa de absorção e pelas propriedades físico-químicas dos agentes anestésicos somados aos fatores respiratórios como a quantidade de sangue que circula pelas brânquias (ZAHL *et al.*, 2009)

Embora se conheçam os resultados da sedação pouco se sabe sobre a forma precisa de atuação dos anestésicos em peixes. Segundo Ueta *et al.* (2007), acredita-se que esta seja similar à anestesia inalatória utilizada em animais terrestres. Em geral, esta ação é acompanhada pela estabilização das membranas neuronais na quantidade de neurotransmissor liberado pelo impulso nervoso, assim como

depressão dos receptores pós-sinápticos, com conseqüente redução na quantidade de neurotransmissor liberado pelo impulso nervoso (ROSS; ROSS, 2008).

Os animais só alcançam o estágio de anestesia quando ocorre uma perda completa ou parcial dos sentidos corporais devido à diminuição das funções nervosas (IWANA e ACKERMAN, 1994). Biologicamente, o procedimento visa reduzir o estresse nos peixes evitando problemas no crescimento e na reprodução. A utilização de uma dose de anestésico correta é importante do ponto de vista econômico, pois evita desperdícios ou a morte dos peixes pelo excesso de exposição ao produto (ROUBACH e GOMES, 2001).

Os sintomas que indicam a sedação dos animais podem ser interpretados erroneamente por observadores inexperientes. As características da anestesia geral em peixes foram descritas primeiramente por Mc Farland em 1960. Uma nova classificação mais detalhada foi feita em 1969, por Mc Farland e Klontz, na qual os autores descrevem seis estágios para anestesia em peixes. Essas descrições vêm sendo usadas e adaptadas até os dias de hoje por autores como Thurmon; Tranquilli e Benson, (1996), Woody *et al.* (2002) e Ross e Ross (2008), e estão descritos de acordo com a (Tabela 1).

TABELA 1 - Estágios de anestesia em peixes.*

Estágio	Descrição	Resposta comportamental em peixes
0	Normal	Reativos a estímulos externos; batimentos operculares normais; reação muscular normal.
Estágio 1	Sedação leve	Reativos a estímulos externos; movimentos reduzidos, batimentos operculares mais lentos; equilíbrio normal.
Estágio 2	Sedação profunda	Perda parcial do tônus muscular; natação errática, aumento dos movimentos operculares; reativos apenas a forte estímulo tátil ou vibração.
Estágio 3	Narcole	Perda total da reatividade aos estímulos externos, exceto forte pressão; leve queda do movimento opercular; equilíbrio normal.
Estágio 4	Anestesia profunda	Perda total de tônus muscular; perda total de equilíbrio; batimento opercular lento, porém regular.
Estágio 5	Anestesia cirúrgica	Ausência total de reação, mesmo a forte estímulo; movimentos operculares lentos e irregulares; batimentos cardíacos lentos; perda total de todos os reflexos.
Estágio 6	Colapso medular	Parada da ventilação; parada cardíaca; morte eventual.

*Modificado de Ross e Ross (2008).

Embora os estágios de sedação sejam bem descritos pela literatura, a sua avaliação é bastante subjetiva e muitas vezes é difícil diferenciar o momento da passagem de um estágio de anestesia para outro (GILDERHUS e MARKING, 1987). A avaliação vai depender de uma série de fatores como habilidade do manipulador dos peixes, dos procedimentos a serem realizados e devem se considerar os fatores biológicos e ambientais discutidos anteriormente, pois estes afetam a taxa metabólica dos peixes e conseqüentemente a farmacocinética dos compostos do anestésico, o que resulta no aumento ou diminuição da sua eficácia (BURKA *et al.*, 1997; ROSS e ROSS, 1999; ROSS e ROSS, 2008)

A farmacocinética do anestésico também influencia no tempo de recuperação dos animais, uma vez que cada composto age de uma forma distinta. Um dos principais fatores que afetam a recuperação dos peixes é o tempo de exposição ao anestésico e as concentrações usadas na sedação dos animais. Assim como a

sedação, a recuperação apresenta diferentes estágios que foram descritos por Hikasa *et al.*, (1986) e são usados até hoje na avaliação dos tempos de recuperação para sedação em peixes (Tabela 2).

TABELA 2 - Estágio de recuperação anestésica em peixe.

Estágio	Resposta Comportamental
1	Reaparecimento dos movimentos operculares
2	Retorno parcial do equilíbrio e da capacidade de nado
3	Recuperação total do equilíbrio
4	Nado e reação para estímulos externos ainda vacilantes
5	Total recuperação do equilíbrio e capacidade normal de nado

*Modificada de Hikasa *et al.*, (1986)

Para Woody *et al.*, (2002), as mudanças comportamentais dos peixes nos diferentes estágios da anestesia são visíveis, iniciando-se com a redução do movimento opercular até a completa perda de reação à manipulação. Estes autores destacam os quatro primeiros estágios como sendo os mais distintos. Para um observador inexperiente as mudanças ocorridas no animal ao passar do estágio 4 para o estágio 5, podem passar despercebidas pois às vezes se mostram muito sutis. Uma vez no estágio 5 é necessário remover os animais da solução anestésica para evitar que avancem para o estágio 6, a fim de se evitar a perda dos animais, ou uma recuperação demorada.

Entretanto, deve-se ter uma atenção especial quanto ao uso dos anestésicos, pois a sua utilização durante o manejo pode apresentar resultados contraditórios. O uso de anestésicos deve ser avaliado com critério, pois concentrações altas associadas ao tempo de exposição prolongado trazem riscos aos peixes, como: danos branquiais, perda de muco, deficiências respiratórias, mortalidade por superdosagem e colapsos medulares (IWAMA e ACKERMAN, 1994; SUMMERFELT e SMITH, 1990; PARK *et al.*, 2008).

Para se evitar os efeitos negativos da prática, é importante estabelecer a sua concentração e o tempo ideal de exposição (INOUE *et al.*, 2003). É necessário o conhecimento da concentração ideal de anestésico correspondente ao estágio desejado de sedação. Essa variação pode ser exemplificada durante a engorda, na

qual os juvenis avançados são na maioria das vezes anestesiados por três principais motivos: 1) realização de biometria; 2) procedimento cirúrgico; e 3) inspeção visual. O estágio de indução necessário para uma biometria é a sedação leve, enquanto que para uma cirurgia ou inspeção visual é necessário que o peixe atinja uma anestesia profunda (ROSS e ROSS, 2008).

Segundo Roubach *et al.*, (2001), os anestésicos sintéticos já são bem conhecidos e utilizados nas pisciculturas, porém são substâncias químicas tóxicas e onerosas. O anestésico ainda pode se acumular no organismo dos animais por um determinado tempo, necessitando de um período de depuração para eliminar esses resíduos (BOOTH, 1988), o que justifica o aumento nas pesquisas com anestésicos naturais. Gonçalves *et al.* (2008) utilizaram o mentol para anestésiar pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Este mesmo anestésico foi utilizado em tambaqui (*Colossoma macropomum*) por Façanha e Gomes (2005). Dentre os anestésicos naturais conhecidos, o óleo de cravo é bastante utilizado, contendo diversos trabalhos na literatura sobre o seu uso como anestésico (COOKE *et al.*, 2004; FRISCH *et al.*, 2007; GUÉNETTE *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2009).

1.4 ÓLEO DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Eugenia caryophyllata*)

O óleo de cravo é extraído do caule, das flores e folhas das espécies *Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica*, e tem como princípio ativo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), que representa de 70 a 90% do óleo (MAZZAFERA, 2003). O óleo de cravo é um produto vegetal muito conhecido e já teve muitas aplicações na medicina popular (LAPEMM, 2005). O eugenol é considerado seguro para humanos, animais e ambiente, e é utilizado como flavorizante na indústria alimentícia e como agente analgésico, antibacteriano, antifúngico, antiviral e anestésico local na odontologia (KEENE *et al.*, 1998; GRIFFITHS, 2000; ROSS e ROSS, 2008).

O óleo de cravo vem ganhando muito destaque entre os anestésicos comumente utilizados em peixes, pois apresenta características ideais para um anestésico, como baixo custo, facilidade de aquisição, alto grau de eficiência, baixa toxicidade, eficácia comprovada e segurança ambiental (KEENE *et al.*, 1998; INOUE *et al.*, 2003; ROSS E ROSS, 2008). Apesar disso, com administrações sucessivas do óleo de cravo, pode ocorrer acúmulo do eugenol no organismo dos peixes

(GUENETTE *et al.*, 2007). Wagner *et al.*, (2002) e Cho e Heat, (2000), afirmam que este fármaco é metabolizado e excretado rapidamente pelo organismo do animal.

Comparado à MS-222 (tricaína metanosulfonato), o eugenol, nas mesmas concentrações, apresenta curto tempo de indução e alto tempo de recuperação anestésica, o que o torna ideal para procedimentos mais demorados (KEENE *et al.*, 1998). Segundo Wagner *et al.*, (2003), o eugenol apresenta um desempenho anestésico melhor que o de outras substâncias já utilizadas e, após sua utilização, não demonstra efeitos deletérios aparentes nos peixes (WOODY *et al.*, 2002). Logo, o óleo de cravo, quando comparado a outros anestésicos, se mostra mais prático no campo e em algumas operações no laboratório, devido à sua capacidade de rápida imobilização dos animais, quando ministrado em baixas concentrações (MUNDAY e WILSON, 1997; CHO e HEATH, 2000; INOUE, 2005).

O eugenol presente no óleo de cravo age provocando depressão do sistema nervoso central por meio da interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-amino-butírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato que atua sobre os receptores N-metil-daspartato (NMD) (YANG *et al.*, 2003). Assim, o eugenol possui boa capacidade de reduzir respostas metabólicas do estresse (MUNDAY e WILSON, 1997; SLADKY *et al.* 2001; PIRHONEN e SCHRECK, 2003; SMALL, 2003). No momento, ainda não foram encontrados traços tóxicos desse produto em animais aquáticos previamente expostos, e nem em outras áreas, como a odontologia, a indústria de alimentos e a fabricação de perfumes, que utilizam amplamente o produto para humanos, sem a constatação de riscos, inclusive ambientais (Barbosa *et al.* 2007).

Vários estudos têm demonstrando os efeitos do óleo de cravo e do eugenol sobre tilápias, tais como Oliveira *et al.*, (2009), Moreira *et al.*, (2010), Simões, Paiva e Gomes (2010), Costa (2011), Delbon e Ranzani Paiva (2012) e Simões (2012). Também existem trabalhos com outras espécies como Jundiá, (*Rhamdia quelen*), (CUNHA *et al.*, 2006, 2010; CUNHA 2007; ANZILIERO *et al.* 2008), Dourado, (*Salminus brasiliensis*), (HISANO *et al.*, 2007, HISANO *et al.*, 2008; PÁDUA *et al.*, 2009), Pacu, (*Piaractus mesopotamicus*), (GONÇALVES *et al.*, 2008), Pampo, (*Trachinotus marginatus*), (OKAMOTO *et al.*, 2008), Plati, (*Xiphophorus maculatus*), (PACHECO, 2009), Lambari, (*Astyanax bimaculatus*), (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; PAULA, 2009), Pirarucu, (*Arapaima gigas*), (HONCZARYK & INOUE, 2009)

Embora haja um número considerável de informações sobre o uso do óleo de cravo e do eugenol como anestésicos na piscicultura, o seu uso ainda é pouco difundido no setor aquícola, mesmo já sendo considerado um método eficaz para eutanásia em peixes (RIBAS *et al.*, 2007). Os resultados obtidos em estudos com o óleo de cravo em peixes demonstram que este cravo é uma alternativa em relação aos produtos sintéticos, normalmente utilizados (INOUE *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2009; PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; VIDAL *et al.*, 2008). Ainda sim são necessários mais estudos para que se possam determinar protocolos eficientes para cada espécie.

1.5 ÓLEO DE MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia*)

A *Melaleuca alternifolia* é conhecida na Austrália como “árvore de chá”, ocorrendo principalmente em áreas de pântano, próximas a rios (RUSSEL e SOUTHWELL, 2002). O óleo essencial das folhas de *M. alternifolia* é muito utilizado na medicina alternativa australiana (KRISTOFFERSEN, ATKIN e SHENFIELD, 1996). Segundo Willians *et al.*, (1990), há evidências de que séculos antes do conhecimento científico sobre os microrganismos, os aborígenes australianos já usavam as folhas esmagadas de *M. alternifolia* para obter um cataplasma de ação antibacteriana.

O óleo de melaleuca é obtido por meio da destilação a vapor das folhas e ramos terminais de *M. alternifolia*. Este óleo é composto principalmente de terpinen-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno, 1,8-cineol e outros produtos químicos (CARSON e RILEY, 2001). Segundo Altman, (1989) estes são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana. Para que tenha eficiência como anti-séptico o comitê australiano de padronização estabelece que o óleo deve conter quantidades de cineol abaixo de 15% e de terpinen-4-ol acima de 30% (Australian Standard As 2782-85).

Devido ao fato do cineol ser conhecido como um irritante da pele, e o terpinen-4-ol apontado como o maior contribuinte da atividade antimicrobiana dentre os componentes, indica-se uma relação entre níveis de concentração mínimos e máximos para cada composto. Os óleos que geralmente são classificados como tendo qualidade superior possuem entre 2 e 5% de cineol e entre 40 a 47% de

terpinen-4-ol (WILLIAMS *et al.*, 1990). É comum encontrar produtos para cuidado com a pele que levam o óleo de melaleuca em sua composição (CARSON, RILEY e COOKSON 1998; GREAY, *et al.*, 2010).

Embora pouco se saiba sobre a ação anestésica do óleo de melaleuca, a atividade de anestesia local não foi atribuída ao terpineol, uma vez que as misturas de isômeros geralmente possuem 65% de α -terpineol. Para observar a ação anestésica da mistura, foi feito, *in vivo*, o teste do reflexo conjuntival em coelhos e *in vitro* no nervo frênico-hemidiafragmal em ratos. A técnica foi demonstrada por Ghelardini, Galeotti e Mazzanti (2001). Resultados semelhantes foram obtidos por Moreira *et al.*, (2001).

Em um trabalho conduzido por Hart *et al.*, (2000), para determinar o mecanismo com que o óleo de melaleuca reduziu a inflamação da pele induzido por histamina, verificou-se que uma solução aquosa de todos os componentes provoca uma redução significativa na resposta à estimulação dos nervos sensoriais. Já o terpinen-4-ol, ao ser estudado separadamente, não apresentou efeito sobre os nervos sensoriais, mas influenciou moderadamente na vasodilatação e no extravasamento do plasma. O 1,8-cineol agiu diretamente nos nervos sensoriais e o α -terpineol exibiu propriedades tanto antiedematosa como anestésica local. Em outro estudo, quando se alimentou ratos e camundongos com 1,8-cineol houve em diminuição da nocicepção química (SANTOS e RAO 2000).

Em relação ao uso do óleo de melaleuca como anestésico em peixes, dispõe-se de poucos registros detalhados de sua ação, sendo os seus efeitos já registrados por autores como Rezende, Vianna e Lanna (2012) e Hajek (2011). Esses autores observaram que o óleo de melaleuca pode sedar os animais em um tempo relativamente curto mantendo-os com a coloração normal e com pouca, ou nenhuma alteração comportamental. O composto também proporciona uma rápida recuperação para os peixes, sendo o único fator desvantajoso apresentado pelo extrato oleoso de melaleuca segundo Rezende, Vianna e Lanna (2012).

O óleo de melaleuca possui os requisitos práticos estabelecidos por Gilderhus e Marcking (1987), como baixo custo e boa margem de segurança para os peixes, o que lhe confere eficiência como um anestésico para esses animais. Esse óleo também foi estudado em trabalhos de outros autores (WEYL, KAISER e HECHT 1996; HSEU *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2008). Sua potência estimada, quando

comparada aos dados presentes na literatura, pode ser considerada semelhante do 2-fenoxietanol (MOHAMED 1999; VELÍSEK e SVOBODOVÁ 2004; LAMBOOIJ *et al.*, 2009), entretanto parece ser aproximadamente 10 vezes mais fraca do que o óleo de cravo (VELÍSEK *et al.*, 2005; HAJEK, KZYSZEJKO e DZIAMAN, 2006).

Segundo Rezende, Vianna e Lanna (2012), o óleo de melaleuca é um composto que necessita de mais estudos, podendo ser usado em um composto misto com o óleo de cravo com o objetivo de maximizar a sua ação e amenizar os efeitos negativos que o óleo de cravo possa ter sobre os animais. Dessa forma a investigação de uma fórmula mista dos dois compostos pode resultar em um anestésico eficiente que não acarrete nenhum dano físico aos indivíduos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é verificar as alterações dos parâmetros hematológicos e do comportamento de tilápia do Nilo em função da sedação com diferentes combinações de óleo de cravo e melaleuca.

2.1.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar o tempo de sedação e recuperação dos peixes nas diferentes combinações de óleo de cravo e melaleuca.

Verificar as alterações dos parâmetros hematológicos (hematócrito, eritrócitos, hemoglobina) no sangue bruto dos peixes, nas diferentes combinações de óleo de cravo e óleo de melaleuca.

Verificar a resposta comportamental dos peixes durante a exposição às diferentes combinações de óleo de cravo e óleo de melaleuca.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi conduzido em novembro de 2014, no setor de Piscicultura DPA/EVZ da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia-GO (Figura 1). As tilápias – (*O. niloticus*) (n= 230 com uma média de 66 g \pm 18,56 g; média \pm desvio padrão) foram obtidas no próprio setor (Figura 2).



FIGURA 1 - Setor de Piscicultura DPA/EVZ da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia-GO.



FIGURA 2 – Tilápia (*O. niloticus*).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial completo (3x7), com 2 fatores (tempo após a indução e proporção de óleo de cravo e óleo de melaleuca), sendo que o primeiro fator teve três níveis: o momento da indução, 1 hora após a indução e 24 horas após a indução. Foram analisados 2 grupos de variáveis, a saber: comportamento do peixe durante e após a indução da anestesia, e parâmetros hematológicos de cada indivíduo.

O segundo fator corresponde a 7 tratamentos: o grupo controle e as 6 combinações de óleo de cravo e melaleuca (0%, 20%, 40%, 60%, 80%, e 100%), sendo 0% composta somente por óleo de cravo, e 100%, composta por óleo de melaleuca puro. Todas essas soluções foram preparadas a uma concentração de 100 mg L, conforme a recomendação de Deblon e Ranzani Paiva (2012).

Utilizaram-se, no total 210 peixes, distribuídos em parcelas de 10 animais resultando um total de 21 parcelas. Adicionalmente um grupo de 20 animais foi submetido à coleta de sangue antes do início do experimento com o objetivo de se determinar os parâmetros hematológicos do grupo livre de anestésicos. Os 210 animais foram separados em 7 tratamentos com 30 peixes, em um total de 3 parcelas de 10 animais por grupo (10 repetições).

Cada grupo de 30 animais foi submetido a uma combinação de óleo de cravo e óleo de melaleuca, e o grupo controle foi submetido às mesmas condições de manejo, porém com ausência de anestésico. Para o processo de indução anestésica e recuperação dos animais utilizaram-se 20 baldes plásticos transparentes de 1,5 litros, e 6 aquários de 10 litros.

Dos 20 baldes plásticos utilizados, 10 foram destinados à individualização do grupo utilizado para avaliar o tempo de indução. A individualização dos animais foi necessária para mensurar os tempos de sedação, e registrar as mudanças comportamentais.

Os 10 baldes plásticos restantes foram utilizados para individualização dos peixes do segundo grupo utilizados para avaliar o tempo de recuperação. A individualização teve como objetivo registrar os tempos de recuperação para cada animal do grupo. Os peixes foram individualizados somente após o último peixe dos grupos submetidos ao tratamento ter alcançado o nível 5 de sedação. As tilápias

permaneceram separadas em água sem anestésico com oxigenação constante. Após 60 minutos de recuperação os peixes foram submetidos à coleta de sangue.

Os 10 peixes do último grupo de cada tratamento permaneceram acondicionados nos aquários de 10 litros com água livre de anestésicos e constantemente oxigenados. Após 24 horas decorrentes do período de sedação os animais foram submetidos à coleta sanguínea. Os aquários foram usados para indução dos animais dos segundos e terceiros grupos, e usados para recuperação e permanência dos animais dos terceiros grupos. Todos os grupos foram submetidos à coleta de sangue.

Para sedação dos animais foram preparados, com o auxílio de baldes plásticos graduados, de 20 litros, um total de 7 litros de água por solução (Tabela 3). A água utilizada para o experimento foi retirada do mesmo poço artesiano que abastece o setor de piscicultura da UFG. As soluções sedativas de óleo de melaleuca e óleo de cravo (Samia[®]) foram diluídas com o auxílio de seringas de 3 e 10 ml, e de uma pipeta de 1ml com um pipetador tipo pêra, a uma proporção de 1:4 em etanol/L, uma vez que estes óleos não são miscíveis em água. A solução foi dividida entre os recipientes onde os peixes ficaram acondicionados, sendo 5 litros da solução destinada ao aquário, e 2 litros divididos igualmente entre os 10 baldes, perfazendo 200 ml por balde.

TABELA 3 – Preparo das soluções experimentais de óleo de cravo e óleo de melaleuca a partir da solução estoque, para 1 litro água. O valor em (%) representa a quantidade de óleo de melaleuca para cada solução, a solução de 0% é composta por óleo de cravo puro.

Ingredientes	Proporção de óleo de melaleuca/óleo de cravo nas soluções (100 mg L)					
	0%/100%	20%/80%	40%/60%	60%/40%	80%/20%	100%/0%
Óleo de Cravo (ml)*	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0
Óleo de Melaleuca (ml)**	0	0,023	0,047	0,07	0,094	0,117
Álcool Etílico (97 ^o) (ml)	0,4	0,412	0,428	0,44	0,456	0,458
Água (ml)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Total das soluções (Melaleuca e Cravo + Álcool) para cada tratamento (ml)	3,5	3,605	3,745	3,85	3,99	4,025

*Valor arredondado, uma vez que a densidade do óleo de cravo é de 1,03 g/ml.

**Densidade do óleo de melaleuca é de 0,885 – 0,906 g/ml.

3.3 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Os animais utilizados no experimento foram mantidos em tanques de alevinagem, onde eram alimentados três vezes ao dia com ração comercial. No dia anterior ao experimento foi suspensa a alimentação dos peixes, observando-se 24 horas de jejum para o início dos trabalhos de sedação.

Os peixes foram capturados com o auxílio de puçás e rede de arrasto e acondicionados e monitorados em caixas plásticas devidamente oxigenadas. As caixas foram abastecidas com água do tanque onde os animais estavam confinados antes da captura. Para determinação do oxigênio dissolvido, pH, amônia, e temperatura, foram coletadas amostras da água de cada caixa, aquário, balde e do tanque. Para determinação dos parâmetros da água utilizaram-se os seguintes equipamentos: medidor de oxigênio eletrônico digital, medidor de pH eletrônico digital e Kit para análise de amônia na água amônia indotest Alfakit[®]. As amostras de água foram coletadas antes e depois da sedação, após 1 hora e 24 horas após a sedação.

3.3.1 Anestesia

Para o início dos trabalhos com anestesia foram preparados 3 aquários com 5 litros de água com solução anestésica, e 10 baldes plásticos transparentes com 200 ml da mesma água contida no aquário em teste (Figura 3). Em cada aquário continha uma solução diferente de acordo com as composições selecionadas para serem testadas no dia. Devido à quantidade de animais e à natureza do experimento optou-se por trabalhar com 3 concentrações por dia, de modo a possibilitar a realização das análises sanguíneas e observação comportamental dos animais. Como foram utilizados 10 baldes para indução anestésica, os mesmos eram sempre esvaziados após a sedação, e enxaguados com água do poço para receberem as novas soluções.

O trabalho de sedação se iniciou sempre no mesmo horário e o intervalo entre o início e o fim das observações foi sempre de uma hora. A exposição à primeira solução anestésica sempre se iniciava às 9:00 h, realizando um tratamento por vez, encerrando a última solução aproximadamente por volta das 10:00 h. Esse intervalo de tempo se mostrou satisfatório devido a rápida ação da concentração de anestésicos usados.



FIGURA 3 – Aquários usados durante o experimento de sedação.

No primeiro dia testaram-se as soluções compostas por óleo de cravo puro (0%) e as soluções de 20% e 40% de óleo de melaleuca. No segundo dia trabalhou-se com as soluções de 60%, 80% e 100% de óleo de melaleuca. No terceiro dia, somente o grupo controle foi submetido ao teste. Como neste dia o grupo não foi exposto a nenhum anestésico optou-se pelo maior tempo de sedação registrado em um dos tratamentos como sendo o tempo de permanência dos animais nos recipientes.

A escolha do horário, sequência, e quantidade de soluções por dia teve como objetivo evitar extensões exaustivas dos testes e minimizar possíveis influências sobre os animais em função do aumento da temperatura da água. Os animais não foram submetidos a nenhuma forma de manejo ou transporte adicional.

Após serem colocados nos aquários e baldes com água contendo anestésico, os animais permaneceram nos recipientes até alcançarem o nível 5 de sedação. O grupo controle permaneceu 19 minutos nos aquários sem anestésicos, simulando o tempo de sedação do grupo tratado com a solução de 100%. Após alcançarem o estágio 5 de sedação, os 10 animais de cada tratamento que estavam individualizados nos baldes foram submetidos à pesagem e coleta de sangue.

Durante o período de exposição aos anestésicos os animais individualizados nos baldes plásticos foram monitorados com a finalidade de se registrarem as alterações comportamentais, as alterações nas colorações, e os tempos de cada fase de sedação (quando possível). Para registrar os tempos, utilizaram-se 5 cronômetros digitais, pranchetas, papel e lápis.

3.3.2 Recuperação

No momento em que o último animal de cada tratamento alcançou o nível 5 de sedação, retiraram-se aleatoriamente 10 peixes, dentre os 20 animais restantes, que foram acondicionados no aquário para indução a anestesia. Os animais foram individualizados nos 10 baldes plásticos destinados a recuperação, onde foi colocado 1 litro de água livre de anestésicos, retirada do poço artesiano. A água foi constantemente oxigenada por uma bomba de ar.

Para registrar o tempo de cada fase de recuperação, usou-se a mesma estratégia descrita para anestesia. Os peixes restantes permaneceram em um dos 3

aquários destinados a recuperação, contendo 8 litros de água do poço sem anestésico e com aeração constante.

Os animais só foram considerados recuperados quando apresentaram uma capacidade normal de nado, e total equilíbrio, de acordo com o estágio 5 na classificação proposta por Hikasa *et al.*, (1986). Os peixes permaneceram confinados nos baldes durante 60 minutos. Após 60 minutos depois da sedação, os 10 peixes acondicionados nos baldes foram submetidos à coleta de sangue e pesagem. Os 10 peixes restantes permaneceram nos aquários até o período de 24 horas após a sedação, quando foram submetidos à coleta sanguínea e pesagem.

O grupo controle foi submetido a todos os procedimentos descritos, com exceção da individualização e observação, uma vez que não estavam sobre o efeito de anestésicos. Os animais usados durante o experimento foram eutanasiados por meio de imersão com o uso de doses elevadas de benzocaína 300 mg/L.

3.4 COLETAS DE SANGUE E ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Na medida em que os peixes alcançavam o estágio 5 de sedação e os animais em recuperação chegavam aos tempos de 1 hora e 24 horas após a indução, os peixes eram selecionados e submetidos a coletas de sangue por meio de punção caudal (Figura 4). Para coleta sanguínea foram usadas seringas de 3 ml com EDTA, como medida preventiva para se evitar a formação de coágulos e hemólise nas amostras.

Durante todo o manejo para coleta sanguínea, os animais foram removidos dos aquários e baldes e depositados em um balde de 20 litros com água do poço artesiano, no qual aguardavam até serem submetidos à coleta das amostras de sangue. Em seguida, os peixes foram pesados e retornaram às caixas plásticas, onde aguardaram até o momento da eutanásia.

Para coleta de sangue os animais foram contidos adequadamente com o uso de uma cama de espuma e um pano úmido sobre os olhos. Foram coletados 0,5 ml de sangue por animal. O material coletado foi depositado em microtubos de 0,5 ml para coleta de sangue com EDTA K2 VACUPLAST®.

Os microtubos foram acondicionados em uma caixa de isopor devidamente refrigerada com gelo. Em seguida, foram transportados para o Laboratório

multiusuário do setor de pós-graduação da E.V.Z da Universidade Federal de Goiás, para serem realizadas as seguintes análises hematológicas: hematócrito, dosagem de hemoglobina e contagem de eritrócitos.



FIGURA 4- Punção caudal

Para realização das análises hematológicas foi utilizado o analisador hematológico automático modelo BC-2800[®] (Mindray) que utiliza o método Coulter para determinação dos dados dos eritrócitos. A determinação do hematócrito foi realizada em microcentrífuga modelo EV 024[®] (EVLAB). A contagem microscópica dos eritrócitos foi realizada em hemocítômetro (Câmara de Neubauer), para comparação e validação dos resultados do analisador hematológico automático frente à espécie animal que foi estudada no trabalho.

Para a análise microscópica dos eritrócitos e leucócitos utilizou-se um microscópio óptico modelo CX 41[®] (Olympus). Para auxiliar na contagem manual dos eritrócitos empregou-se também o contador diferencial de células modelo CCS-01[®] (Kacil).

Para a dosagem da hemoglobina foi utilizado kit comercial Doles[®], pelo método da cianomethohemoglobina descrito por KAMPEN & ZIJLSTRA (1964), por espectrofotometria e uso de solução padrão de hemoglobina estandardizada em 546 nm em espectrofotômetro semiautomático, modelo BIO 2000[®] (Bioplus). Para

determinação manual foram utilizadas soluções hematológicas Rees Ecker e solução de Natt-Harrick.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no experimento foram submetidos a uma análise de variância no intuito de verificar se houve diferença significativa ou não entre os tratamentos. Os parâmetros da água não apresentaram diferença significativa entre as medias ($p > 0,05$). Já para as análises hematológicas, foi observada uma variação significativa ($p < 0,05$) nos tempos de sedação e recuperação entre as médias.

As análises que apresentaram uma diferença significativa entre as medias ($p < 0,05$), foram submetidos ao teste de Scott Knott (1974).

Optou-se pelo teste de Scott Knott como mais indicado, uma vez que este visa à separação de médias de tratamentos em grupos distintos por meio da minimização da variação dentro dos grupos e maximização da variação entre grupos. Devido à ausência de ambiguidades, os resultados são mais facilmente interpretados. Desta forma este procedimento resulta em maior objetividade e clareza (BORGES e FERREIRA, 2003).

Foi realizada também uma análise de correlação para verificar se existiu relação entre as variáveis observadas no trabalho, e se estas variáveis foram acompanhadas por outras variáveis quando registrada alguma alteração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARÂMETROS DA ÁGUA

4.1.1 Temperatura

A maior temperatura registrada foi de 30°C e a menor, de 24°C (Tabela 4). Este intervalo está de acordo com o recomendado para a maioria dos peixes tropicais durante atividades de transporte. Segundo Vieira *et al.* (2003), a faixa ideal de temperatura está entre 20 e 30°C, sendo considerado o nível ótimo para a maioria das espécies entre 25 e 28°C. Baldisserotto, (2002) ressalta que variação da temperatura corporal afeta a velocidade das reações químicas: seu aumento eleva a energia cinética dos átomos e moléculas, facilitando as reações. A temperatura não foi um fator de estresse para os peixes, mantendo-se em condições ótimas para o bem estar dos animais.

TABELA 4 – Temperatura (C°) da água na indução de juvenis de tilápia do Nilo nas diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma concentração de 100mg/L antes da indução, no momento da indução, 1 hora após, e 24 horas.

Tempos	Soluções de óleo de cravo/óleo de melaleuca*						
	0%/ 100%	20%/ 80%	40%/ 60%	60%/ 40%	80%/ 20%	100%/ 0%	**Controle
Antes da Indução	26,1	26,3	26	27,5	26,3	26,8	26,1
Indução	29	30	30	26,1	26,2	29,8	26,1
Recuperação	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2
1 hora	27,6	28,3	27,6	26,3	26,5	25,6	26,5
24 horas	25	24	24,6	27,5	27,2	24	26,8

*Soluções de óleo de cravo e óleo melaleuca nas quais 0% corresponde a óleo de cravo puro, e 100% a óleo de melaleuca puro, de modo que os valores representam as concentrações de óleo de melaleuca em cada solução.

**O grupo controle não foi sedado.

As alterações na temperatura não foram significativas ($p > 0,05$). Porém observou-se um alto coeficiente de variação igual a 0,64. Esse valor elevado para o coeficiente de variação não permite uma avaliação estatística precisa dos dados. No entanto, o aumento na temperatura da água para as soluções de 0%, 20%, 40%, e 100% durante o momento da indução podem estar relacionados à adição dos anestésicos e a densidade de animais contidos em cada aquário.

4.1.2 Potencial de hidrogeniônico (pH)

O pH inicial da água foi 6,42 e o pH final foi 8,33 esses valores encontram-se no limite desejável para alevinos e juvenis de tilápia do Nilo, pois a faixa ideal para a espécie segundo Kubitzka (2000), é de 6,0 a 8,5. As maiores elevações no nível de pH foram observadas após 24 horas (Tabela 5).

TABELA 5 – pH da água na indução de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) expostos a diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma concentração de 100mg/L após a indução, e 1 hora após, e 24 horas.

Tempos	Soluções de óleo de cravo e óleo melaleuca*						
	0%	20%	40%	60%	80%	100%	**Controle
Antes de Indução	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71
Indução	6,8	6,42	6,52	6,53	6,53	6,6	6,74
Recuperação	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
1 hora	6,4	6,8	6,9	6,86	6,88	6,6	6,93
24 horas	8,23	7,05	8,33	7,53	7,4	7,03	7,26

*Soluções de óleo de cravo e óleo melaleuca nas quais 0% corresponde a óleo de cravo puro, e 100% a óleo de melaleuca pura, de modo que os valores representam as concentrações de óleo de melaleuca em cada solução.

** O grupo controle não foi sedado.

Não houve diferença significativa entre as médias ($P > 0,05$) segundo a análise de variância e devido ao coeficiente de variação de 0,59. O aumento nos valores do pH da água 24 horas após a indução podem estar relacionados a aeração constante dos aquários de recuperação. Os aquários foram oxigenados constantemente

durante o período de 24 horas, o que pode ter diminuído a concentração de CO₂ na água, resultando no aumento do pH.

4.1.3 Amônia

Após todos os animais terem alcançado o estágio 5 de sedação em cada concentração, o nível de amônia não ionizada observado foi de 0,00 a 1,25 mg/L. De acordo com Kubitzka (1999), níveis de amônia ionizada entre 0,70 e 2,40 mg/L podem ser letais para os peixes quando expostos por curto período de tempo. Embora não se tenha registrado perda de animais durante o experimento, observou-se que em algumas concentrações o nível de amônia ficou dentro do intervalo descrito acima (Tabela 7 e Figura 5).

TABELA 7 - Níveis de amônia (mg/L) na água antes e após a indução de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) expostos a diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma concentração de 100mg/L.

Tempos	Soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca*						
	0%	20%	40%	60%	80%	100%	**Controle
Antes da indução	0	0	0	0	0	0	0
Após a indução	1,25	0,805	0,485	0,494	0,426	0	1,073

*Soluções de óleo de cravo e óleo melaleuca nas quais 0% corresponde a óleo de cravo puro, e 100% a óleo de melaleuca pura, de modo que os valores representam as concentrações de óleo de melaleuca em cada solução.

** O grupo controle não foi sedado.

Em relação à temperatura e o pH da água observados no momento da indução, os tratamentos que continham as soluções de 0%, 20%, e o grupo controle apresentaram maiores concentrações de amônia ionizada. Essas concentrações podem ser letais para os peixes levando os animais a morte. Durante a indução não foi observado a morte de nenhum animal, o que pode estar relacionado ao curto tempo de exposição dos animais durante a indução.

Níveis de Amônia

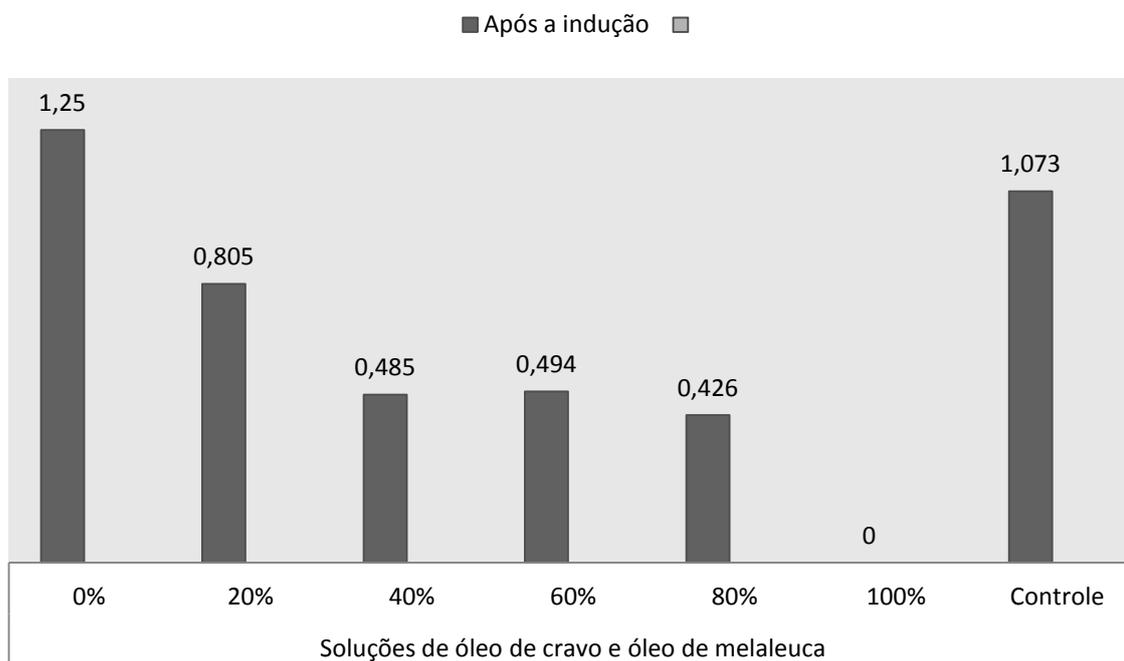


FIGURA 5 – Níveis de amônia das amostras de água referente às soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% e grupo controle, nos momentos anteriores e posteriores a indução.

Oliveira (2007) observou o aumento da amônia ao trabalhar com alevinos de tilápias sob a ação do óleo de cravo para transporte. O autor registrou uma variação de 0,05 para 3,59 mg/L, essa variação se assemelha aos resultados encontrados neste trabalho. Os valores dos níveis de amônia apresentados na Tabela 8 e na Figura 6 estão relacionados à quantidade de animais, pois a densidade de animais e o fato de estarem alocados em aquários sem renovação da água por 24 horas resultaram no acúmulo de excretas, nitrogenados.

TABELA 8 - Variação dos níveis de amônia (mg/L) na água após a indução, 1 hora e 24 horas após a indução de juvenis de tilápia do Nilo expostos a diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma concentração de 100mg/L.

Tempos	Soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca*						
	0%	20%	40%	60%	80%	100%	**Controle
Após a indução	1,25	0,805	0,485	0,494	0,426	0	1,073
1 hora	0,245	0,134	0,07	0,619	0,391	0,435	0,391
24 horas	1,934	2,807	3,283	3,667	4,233	2,238	4,029

*Soluções de óleo de cravo e óleo melaleuca nas quais 0% corresponde a óleo de cravo puro, e 100% a óleo de melaleuca pura, de modo que os valores representam as concentrações de óleo de melaleuca em cada solução.

** O grupo controle não foi sedado.

Níveis de Amônia, após a indução e recuperação

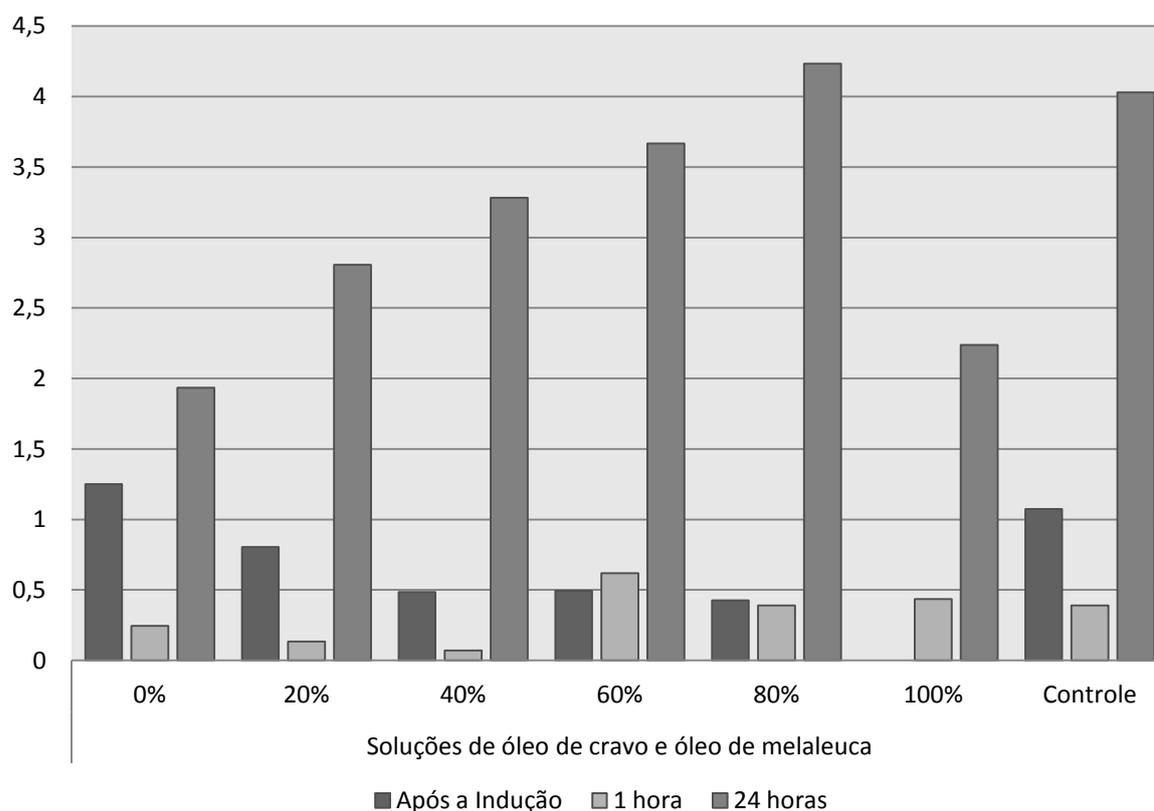


FIGURA 6 - Níveis de amônia das amostras de água referente às soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% e grupo controle, após a indução, 1 hora, e 24 horas após a indução.

Neste trabalho observou-se que os níveis de amônia ionizada foram considerados letais em relação ao pH e a temperatura da água dos tratamentos após 24 horas. Os valores observados para concentração de amônia foram elevados em quase todos os tratamentos após 24 horas, tendo como única exceção o tratamento referente à solução de 20%. Entretanto não foi registrada a perda de nenhum animal, o que leva a crer que o tempo de exposição dos peixes a estas concentrações não foi suficiente para ocasionar a morte dos organismos. Oliveira (2008) sugere que concentrações de amônia ionizada de 2,6 mg/L são letais a partir de 96 horas.

Não houve diferença significativa entre as médias ($P > 0,05$) segundo a análise de variância. Devido ao alto coeficiente de variação 1,41 observado durante o experimento. Dessa forma é possível afirmar que as soluções anestésicas usadas não afetaram as concentrações de amônia nos aquários. Os peixes permaneceram confinados em aquários, oxigenados constantemente, porém não houve renovação da água até a finalização do experimento.

O aumento da amônia ocorre em sistemas fechados onde não há renovação da água. O aumento na concentração de amônia é preocupante, pois é um agente estressor que promove a liberação de hormônios corticosteroides na circulação sanguínea dos animais e desencadeia as respostas metabólicas, iônicas e hematológicas características do estresse (GONÇALVES *et al.*, 2010).

Os aumentos nos níveis de amônia observados para os tratamentos e o grupo controle após 24 horas foram crescentes em relação à concentração de óleo de melaleuca nas soluções, ou seja, quanto maior a concentração de óleo de melaleuca nas soluções, maior foram os níveis de amônia observados na água. No entanto quando observamos o tratamento submetido à solução de 100% (óleo de melaleuca puro) os níveis de amônia se encontram em níveis mais baixos, próximos aos valores observados para os tratamentos submetidos à solução de 0% (óleo de cravo puro).

Esse efeito está relacionado ao tempo de recuperação dos peixes (Tabela 22), os tratamentos onde os animais apresentaram um menor tempo de recuperação tiveram níveis menores de amônia após 24 horas. Entretanto no momento da indução a concentração de óleo de cravo nas soluções coincidiu com o aumento dos níveis de amônia, ou seja, quanto maior a concentração de óleo de cravo, maior foram

os níveis de amônia observados. É possível inferir que ao se recuperarem rápido dos efeitos dos anestésicos, os animais não sofrem estresse resultante da retomada dos reflexos e recuperação do equilíbrio. Outro fator é o aumento do metabolismo, ou seja, se a recuperação ocorre em um curto tempo os animais não apresentam um aumento imediato do metabolismo, o que resulta em uma menor liberação de excretas nitrogenada na água.

4.1.4 Oxigênio dissolvido (OD)

O oxigênio dissolvido variou de 0,36 a 7,84 mg/L. Não foram observadas diferenças significativa entre as médias ($P > 0,05$) segundo a análise de variância. Essa ausência ou ocorrência de diferenças significativas não pode ser comprovada devido ao alto coeficiente de variação igual a 0,39 observado durante o experimento.

TABELA 9 - Oxigênio dissolvido (mg/L) na água utilizada para indução e recuperação, nos momentos antes da indução, após a indução, antes da recuperação, 1 hora após a indução e 24 horas após a indução de juvenis de tilápia do Nilo, expostos a diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma concentração de 100mg/L.

Tempos	Soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca*						
	0%	20%	40%	60%	80%	100%	**Controle
Antes da Indução	7,80	7,73	7,84	7,68	7,75	7,83	7,56
Indução	7,43	7,56	7,69	2,97	2,75	7,54	5,81
Antes da recuperação	6,32	6,32	6,32	6,32	6,32	6,32	6,32
1 hora	5,2	5,8	5,7	5,29	5,28	5,78	5,36
24 horas	0,36	2,26	1,84	4,82	5,2	2,31	2,96

*Soluções de óleo de cravo e óleo melaleuca nas quais 0% corresponde a óleo de cravo puro, e 100% a óleo de melaleuca pura, de modo que os valores representam as concentrações de óleo de melaleuca em cada solução.

** O grupo controle não foi sedado.

4.1.5 Parâmetros Hematológicos

Foi observado que os resultados dos parâmetros hematológicos apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) segundo a análise de variância (Tabelas 10 e 11). Essas diferenças foram registradas entre os grupos expostos as soluções, a indução anestésica e os tempos de recuperação para o hematócrito (Ht) (Tabela 12), e a taxa de hemoglobina (Hb) (Tabela 13).

TABELA 10 – Quadro resumo da análise de variância dos valores do hematócrito (Ht) observados em juvenis de tilápia do Nilo, expostos a diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma concentração de 100mg/L.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	154168,1	10	15416,81	786,9624	0,00	1,94004
Dentro dos grupos	1723,944	88	19,59027			
Total	155892	98				

TABELA 10 – Quadro resumo da análise de variância dos valores da taxa de hemoglobina (Hb) observados em juvenis de tilápia do Nilo, expostos a diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma concentração de 100mg/L.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	20,002	6	3,333667	5,471434	0,000131	2,246408
Dentro dos grupos	38,385	63	0,609286			
Total	58,387	69				

TABELA 12 – Media (\pm dp) do hematócrito (Ht) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle desprovido de anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções*	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	26,41 \pm 1,90 ^{aA}	24,46 \pm 3,15 ^{aA}	26,35 \pm 1,90 ^{aA}
20%/80%	26,43 \pm 3,68 ^{aA}	22,59 \pm 2,44 ^{aB}	23,42 \pm 3,06 ^{bB}
40%/60%	27,38 \pm 2,94 ^{aA}	21,81 \pm 4,21 ^{aB}	22,53 \pm 2,09 ^{bB}
60%/40%	26,05 \pm 2,99 ^{aB}	24,49 \pm 2,47 ^{aB}	27,91 \pm 2,02 ^{aA}
80%/20%	25,67 \pm 2,97 ^{aA}	23,40 \pm 2,42 ^{aB}	27,03 \pm 1,86 ^{aA}
100%/0%	25,06 \pm 3,19 ^{aA}	24,40 \pm 3,70 ^{aA}	21,89 \pm 2,91 ^{bB}
Controle**	23,59 \pm 2,02 ^{aA}	23,01 \pm 1,86 ^{aA}	24,59 \pm 2,88 ^{bA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Os resultados do hematócrito (Ht) para indução, e recuperação após 1 hora não apresentaram diferença significativa entre o grupo controle e as soluções. Entretanto após 24 horas os valores dos hematócritos para as soluções de 0%, 60% e 80 % diferiram do grupo controle e das soluções de 20%, 40% e 100%. Em relação ao momento de indução, 1 hora e 24 horas após a indução a solução de 0% e o grupo controle não apresentaram diferença significativa entre os valores do hematócrito.

TABELA 13 - Media (\pm dp) da taxa de hemoglobina (Hb) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle sem anestésico. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	9,42 \pm 0,78 ^{aA}	8,92 \pm 0,80 ^{aA}	9,51 \pm 0,71 ^{aA}
20%/80%	9,52 \pm 0,69 ^{aA}	8,35 \pm 0,93 ^{aB}	8,28 \pm 1,11 ^{bB}
40%/60%	9,48 \pm 0,74 ^{aA}	8,93 \pm 0,93 ^{aA}	8,02 \pm 0,65 ^{bB}
60%/40%	8,80 \pm 0,99 ^{bA}	8,64 \pm 0,93 ^{aA}	9,38 \pm 0,98 ^{aA}
80%/20%	8,59 \pm 0,89 ^{bB}	8,24 \pm 0,98 ^{aB}	9,23 \pm 0,75 ^{aA}
100%/0%	8,74 \pm 0,66 ^{bA}	8,73 \pm 0,71 ^{aA}	7,57 \pm 1,10 ^{bB}
Controle	7,96 \pm 0,60 ^{cA}	8,22 \pm 0,59 ^{aA}	8,37 \pm 0,79 ^{bA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Os resultados do hematócrito indicaram um aumento nos valores durante a indução, e se reduziram após 1 hora de recuperação. O grupo controle se manteve estável durante a indução até 24 horas após a indução, ou seja, não apresentou nenhuma diferença significativa no decorrer do experimento. Os grupos tratados com as soluções de 20%, 40% e 80% apresentaram uma diferença significativa para os valores do hematócrito, e também foram os que tiveram maior redução nos valores deste parâmetro após 1 hora em relação à indução. Os demais grupos não diferiram em relação aos valores de hematócritos observados no momento da indução e 1 hora após.

O aumento no hematócrito dos peixes no momento da indução é uma característica que já foi registrada por autores como Delbon (2010) e Simões *et al.*, (2012) que usaram eugenol e óleo de cravo para anestésias tilápias do Nilo. Esse aumento no hematócrito também foi observado por Inoue *et al.*, (2011) ao submeter tambaquis a banhos anestésicos com eugenol.

Segundo Morales *et al.* (2005), o aumento dos valores de hematócrito indicam hemoconcentração ocasionada pelo aumento da demanda por oxigênio, o que leva o animal a retornar a situação de estresse. Foi observado nesse trabalho que os anestésicos ocasionam déficit respiratório pela diminuição dos batimentos operculares, o que leva os animais a um estado de hipóxia tecidual, e possíveis alterações na pressão arterial e dilatação de vasos periféricos. Segundo Pádua *et al.*, (2012) estes efeitos estão associados a farmacodinâmica de cada anestésico, nos quais a intensidade e gravidade das alterações depende do mecanismo de ação de cada grupo farmacológico.

Como foi observado durante o experimento uma maior ocorrência de hiperventilação nos animais expostos as soluções de 0%, 20%, e 40 %, esse comportamento pode indicar um desconforto causado pelo óleo de cravo. Nas soluções de 60%, 80% e 100 % não foi observada hiperventilação nos animais, mas os peixes levaram um tempo maior para alcançarem o estágio 5 de sedação (Tabela 13).

Essa extensão no tempo de sedação pode submeter os animais a um maior tempo de hipóxia tecidual, resultando em aumento do hematócrito. Entretanto no momento da indução o aumento do hematócrito foi mais expressivo para os grupos tratados com as soluções de 20%, e 40%, é possível que a irritação causada pelo óleo de cravo aumente o estresse agudo nos animais, influenciando ainda mais o aumento do hematócrito. Já para o grupo submetido à solução de 100 % de óleo de melaleuca puro 1 hora após a indução os valores do hematócrito se mantiveram estáveis (Tabela 12).

Após 24 horas foi observado um pequeno aumento no hematócrito dos animais, com exceção dos valores dos grupos submetidos à solução com 100% de óleo de melaleuca puro, onde se observou uma redução significativa no valor do hematócrito, diferindo significativamente dos valores observados no momento da indução e após 1 hora. As concentrações que apresentaram o maior aumento diferindo significativamente dos valores observados no tempo de 1 hora após a indução foram às soluções de 60% e 80%.

A redução no hematócrito 1 hora após a sedação pode estar relacionada à sedação profunda e à recuperação, pois à medida que os animais se recuperam, os batimentos operculares voltam à frequência normal, indicando a redução da

demanda por oxigênio. Ao serem submetidos a uma sedação profunda, os peixes sofrem uma redução nos batimentos cardíacos, o ritmo cardíaco ainda permanece reduzido, mesmo estando recuperados completamente após a sedação, o que leva os peixes a apresentarem um comportamento menos hiperativo.

Simões *et al.*, (2012) também observaram um aumento significativo dos valores de hematócrito logo após a anestesia (0h), em todos os tratamentos onde (*O. niloticus*) foram expostos a diferentes concentrações de óleos de cravo. Segundo estes autores, o hematócrito dos peixes do tratamento-controle foi menor, enquanto o hematócrito dos peixes submetidos às concentrações de óleo de cravo foi maior logo após a anestesia (tempo 0h) deferindo significativamente ($p < 0,05$), e apresentaram valores menores de hematócrito nos tempos 12h, 48h e 96h após a anestesia.

O uso dos anestésicos pode ocasionar um aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos, em razão de distúrbios de permeabilidade da membrana destas células (TAVARES-DIAS *et al.*, 2008; INOUE *et al.*, 2011). Esse aumento na fragilidade osmótica pode ser o responsável pelos aumentos no hematócrito e hemoglobina. Pádua *et al.*, (2012) também observaram um aumento nos valores de hematócrito de tuviras (*Gymnotus aff. inaequilabiatus*) quando expostas ao óleo de cravo e seus derivados. Estes resultados se assemelham aos resultados apresentados neste trabalho.

Em relação aos valores da taxa de hemoglobina (Hb), foi observado que durante o momento da indução os grupos tratados com as soluções de 0%, 20% e 40 % não apresentaram diferença significativa entre si, mas diferiram dos animais tratados com as soluções de 60%, 80%, 100% e do grupo controle. Já os grupos submetidos às soluções de 60%, 80% e 100 % não apresentaram diferença significativa entre si, e o grupo controle diferiu de todos os grupos observados (Tabela 13).

Para o tempo de 1 hora após a indução não foi registrado uma diferença significativa dos valores de hemoglobina entre os grupos tratados com as soluções e o grupo controle. Já para o tempo de 24 horas após a indução observou-se que os valores de hemoglobina dos peixes tratados com as soluções de 0%, 60%, e 80% não diferiram entre si, apresentando, porém uma diferença significativa em relação

aos grupos sedados com as soluções de 20%, 40%, 100% e o grupo controle, os mesmos não diferiram de forma significativa entre si.

Essa heterogeneidade entre os valores de hemoglobina observados após 24 horas pode estar relacionada ao estresse químico, e ao mecanismo fisiológico de compensação frente à hipóxia. Após 24 horas observou-se uma elevação na concentração de amônia e nos valores de pH, acompanhadas pela redução no oxigênio dissolvido na água, essas condições podem manter o peixe permanentemente estressado.

Já o mecanismo fisiológico de compensação resulta em liberação das células estocadas nos centros hematopoiéticos e muitas vezes, estas células não estão totalmente maduras. Segundo Satake *et al.*, (2009) a biossíntese de hemoglobina encontra-se ativa nestas células, possuindo baixa concentração deste pigmento respiratório. Se, durante o período de 24, não houver hemodiluição, é natural que a hemoglobina aumente em função da biossíntese e da maturação dos heritroblastos.

Os valores da concentração de hemoglobina (Hb), em relação aos tempos de indução, 1 hora e 24 horas após a indução, não apresentaram diferença significativa, para os grupos tratados com as soluções de 0%, 60% e o grupo controle, se mantendo estáveis. Os grupos submetidos as concentrações de 20% e 40 % apresentaram maior valor na concentração de hemoglobina durante a indução, Já nas amostras coletadas após 1 hora observou-se nos grupos tratados com a solução de 20%, uma redução nos valores de hemoglobina, e estes valores continuaram a reduzir após 24 horas. No grupo submetido a solução de 40%, a redução na concentração de hemoglobina só foi significativa após 24 horas (tabela 13).

Os grupos tratados com as soluções de 60%, 80% e 100% de óleo de melaleuca, mantiveram os valores da hemoglobina mais baixos durante a indução, e após 1 hora esses valores não sofreram variação significativa. Após 24 horas foi registrado um aumento nos valores da hemoglobina para os grupos submetidos as soluções de 60% e 80%, sendo os peixes tratados com a solução de 100% os únicos que apresentaram redução na hemoglobina após 24 horas. O grupo controle se manteve estável em relação à concentração de hemoglobina no momento da indução a sedação, 1 hora após a sedação, e 24 horas após.

Para os demais parâmetros hematológicos não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o fatorial e a testemunha. No entanto, alguns grupos diferiram entre si

e os tempos de indução e recuperação para número de eritrócitos (Hem) (Tabela 14), volume corpuscular médio (Vcm) (Tabela 15), hemoglobina corpuscular média (Hcm) (Tabela 16), concentração de hemoglobina corpuscular média (Chcm) (Tabela 17), do índice de anisocitose (Rdw) (Tabela 18), contagem total de plaquetas (Plt) (Tabela 19), volume plaquetário médio (Mpv) (Tabela 20), plaquetócrito (Pct) (Tabela 21).

TABELA 14 - Media (\pm dp) do número de eritrócitos (Hem) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos à indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle sem anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/110%	1,807 \pm 0,16 ^{aA}	1,795 \pm 0,27 ^{aA}	1,945 \pm 0,18 ^{aA}
20%/80%	1,785 \pm 0,27 ^{aA}	1,577 \pm 0,20 ^{bA}	1,753 \pm 0,25 ^{bA}
40%/60%	1,888 \pm 0,21 ^{aA}	1,494 \pm 0,37 ^{bB}	1,727 \pm 0,21 ^{bA}
60%/40%	1,812 \pm 0,17 ^{aB}	1,907 \pm 0,30 ^{aB}	2,063 \pm 0,22 ^{aA}
80%/20%	1,725 \pm 0,18 ^{aB}	1,788 \pm 0,12 ^{aB}	1,964 \pm 0,16 ^{aA}
100%/0%	1,749 \pm 0,19 ^{aA}	1,652 \pm 0,28 ^{bA}	1,593 \pm 0,26 ^{bA}
Controle	1,625 \pm 0,10 ^{aA}	1,690 \pm 0,16 ^{bA}	1,729 \pm 0,16 ^{bA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Os valores do número dos eritrócitos (Hem) para a indução não diferiram significativamente entre os grupos tratados com as soluções. Entretanto, 1 hora após a indução, as médias dos grupos tratados com as soluções de 0%, 20%, 100 % de óleo de melaleuca e o grupo controle não diferiram entre si, mas apresentaram diferença significativa em relação aos grupos tratados com as soluções de 40%, 60% e 80 %. Após 24 horas observou-se que os grupos tratados com as soluções de 20%, 40%, 100% e o grupo controle, não diferiam entre si, mas diferiram dos grupos tratados com as soluções de 0%, 60%, e 80%.

Em relação ao momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução os grupos submetidos às soluções de 0%, 20%, 100% de óleo de melaleuca e grupo controle, não apresentaram nenhuma diferença significativa, mas os grupos tratados com as soluções de 40%, 60%, e 80%, diferiram entre o momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução. O grupo tratado com a solução de 40% sofreu uma redução no valor do número de eritrócitos, após 1 hora, mas este valor voltou a aumentar após 24 horas. Os grupos expostos às soluções de 60%, e 80 % apresentaram aumentos no valor do número de eritrócitos após 1 hora e 24 horas, sendo atribuídos a estes peixes e aos peixes tratados com a solução de 0% (óleo de cravo puro), os maiores níveis no número de eritrócitos registrados no trabalho (Tabela 13).

De acordo com o que foi observado no trabalho, os valores dos números de eritrócitos podem ter sido influenciados pela hipóxia causada pelo tempo de sedação, e pelo estresse resultante da irritação causado pelo óleo de cravo. Sudagara *et al.*, (2009), observou o aumento nos valores dos eritrócitos em (*R. rutilus*) anestesiados com concentrações crescentes de cravo em pó (175, 225, 275 e 350 mg/L). Mohammadzarejabad *et al.*, (2010) também observaram um efeito similar no esturjão (*Huso huso*) ao avaliar essas mesmas concentrações deste anestésico.

Os valores médios do volume corpuscular médio (Vcm) observado no momento da indução, e 24 horas após a indução da sedação, não apresentaram diferença significativa entre os grupos expostos às soluções. Entretanto, as amostras coletadas nos peixes após 1 hora apresentaram diferença significativa entre os animais tratados com as soluções de 20%, 40% e 100% de óleo de melaleuca, que diferiram dos grupos tratados com as soluções de 0% (óleo de cravo puro), 60%, e grupo controle. Os peixes tratados com a solução de 80% foram os que apresentaram o menor valor médio para o volume corpuscular médio, diferindo de todos os grupos observados no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução (Tabela 15).

TABELA 15 - Média (\pm dp) do volume corpuscular médio (Vcm) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle desprovido de anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	144,26 \pm 8,03 ^{aA}	136,92 \pm 8,13 ^{bB}	135,63 \pm 8,95 ^{aB}
20%/80%	148,15 \pm 8,32 ^{aA}	144,20 \pm 10,69 ^{aA}	134,96 \pm 29,54 ^{aB}
40%/60%	145,51 \pm 6,42 ^{aA}	149,94 \pm 13,34 ^{aA}	131,41 \pm 10,58 ^{aB}
60%/40%	142,29 \pm 12,44 ^{aA}	133,09 \pm 6,82 ^{bB}	135,25 \pm 7,57 ^{aB}
80%/20%	148,54 \pm 6,66 ^{aA}	127,56 \pm 9,82 ^{cC}	138,42 \pm 6,68 ^{aB}
100%/0%	143,68 \pm 8,61 ^{aA}	147,81 \pm 8,07 ^{aA}	138,36 \pm 11,19 ^{aA}
Controle	145,43 \pm 6,31 ^{aA}	136,74 \pm 6,19 ^{bA}	139,87 \pm 3,07 ^{aA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Para a variação dos valores médios do volume corpuscular médio em relação ao momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução, somente o grupo tratado com a solução de 100% de óleo de melaleuca puro e o grupo controle não apresentaram diferença significativa. Os peixes tratados com as soluções de 0% óleo de cravo puro, 60% e 80% apresentaram uma redução nos valores médios do volume corpuscular médio, porém estes valores mantiveram-se estáveis após 24 horas, exceto no grupo tratado com a solução de 80%, que apresentou um aumento no valor médio do volume corpuscular médio após 24 horas. Os peixes submetidos às soluções de 20% e 40% só apresentaram uma redução significativa do valor médio do volume corpuscular médio 24 horas após a indução (Tabela 16).

TABELA 16 – Media (\pm dp) da hemoglobina corpuscular médio (Hcm) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle desprovido de anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	51,30 \pm 3,66 ^{aA}	50,72 \pm 7,08 ^{bA}	49,09 \pm 3,52 ^{aA}
20%/80%	54,94 \pm 7,41 ^{aA}	53,75 \pm 8,68 ^{bA}	47,32 \pm 2,98 ^{aB}
40%/60%	50,34 \pm 2,17 ^{aB}	62,44 \pm 13,39 ^{aA}	46,63 \pm 2,61 ^{aB}
60%/40%	48,50 \pm 2,68 ^{aA}	46,72 \pm 1,28 ^{cA}	45,26 \pm 1,65 ^{aA}
80%/20%	49,67 \pm 1,93 ^{aA}	44,85 \pm 2,68 ^{cA}	46,97 \pm 1,36 ^{aA}
100%/0%	50,19 \pm 4,10 ^{aA}	52,87 \pm 5,46 ^{bA}	47,81 \pm 3,36 ^{aA}
Controle	48,93 \pm 1,96 ^{aA}	48,75 \pm 2,21 ^{cA}	48,40 \pm 1,33 ^{aA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Foi observado que os valores da hemoglobina corpuscular média (Hcm) não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados com as soluções e o grupo controle durante a indução, e 24 horas após a indução. Após 1 hora os peixes tratados com as soluções de 0%, 20% e 100% de óleo de melaleuca diferiram dos animais expostos às soluções de 60% e 80% e do grupo controle.

Os peixes tratados com a solução de 40% apresentaram o maior valor médio na hemoglobina corpuscular média, diferindo significativamente de todos os grupos expostos as demais soluções 1 hora após a indução. Entre o momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução, somente os grupos tratados as soluções de 20% e 40% apresentaram uma variação significativa.

TABELA 17 – Media (\pm dp) da concentração de hemoglobina corpuscular média (Chcm) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle sem anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	35,64 \pm 1,82 ^{aA}	37,11 \pm 3,66 ^{bA}	36,08 \pm 1,77 ^{aA}
20%/80%	36,19 \pm 4,40 ^{aA}	37,24 \pm 4,51 ^{bA}	34,85 \pm 1,74 ^{aA}
40%/60%	34,71 \pm 1,94 ^{aB}	41,62 \pm 6,47 ^{aA}	35,61 \pm 1,63 ^{aB}
60%/40%	33,79 \pm 1,77 ^{aA}	35,21 \pm 1,65 ^{bA}	34,02 \pm 1,73 ^{aA}
80%/20%	33,46 \pm 1,28 ^{aA}	36,06 \pm 0,63 ^{bA}	34,08 \pm 1,41 ^{aA}
100%/0%	35,10 \pm 2,92 ^{aA}	35,67 \pm 2,56 ^{bA}	34,64 \pm 1,04 ^{aA}
Controle	33,71 \pm 1,98 ^{aA}	35,72 \pm 1,23 ^{bA}	34,58 \pm 1,18 ^{aA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Os valores das concentrações de hemoglobina corpuscular média (Chcm), não apresentaram uma diferença significativa entre os grupos submetidos às soluções e o grupo controle durante a indução, 1 hora, e 24 horas após a indução. Em relação aos tempos, somente os peixes expostos a solução de 40% apresentaram uma variação significativa, ocasionada pelo aumento do valor médio das concentrações de hemoglobina corpuscular média 1 hora após a indução (Tabela 15).

TABELA 18 - Media (\pm dp) da determinação do índice de anisocitose (Rdw) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle sem anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	13,12 \pm 3,50 ^{aA}	14,69 \pm 5,62 ^{cA}	9,65 \pm 1,83 ^{aB}
20%/80%	17,75 \pm 9,60 ^{aA}	19,94 \pm 9,13 ^{bA}	13,84 \pm 2,73 ^{aB}
40%/60%	14,20 \pm 1,95 ^{aB}	24,36 \pm 12,34 ^{aA}	11,82 \pm 1,32 ^{aB}
60%/40%	12,48 \pm 1,41 ^{aA}	10,01 \pm 2,50 ^{cA}	9,19 \pm 1,72 ^{aA}
80%/20%	12,60 \pm 1,28 ^{aA}	10,49 \pm 2,26 ^{cA}	9,79 \pm 2,19 ^{aA}
100%/0%	14,30 \pm 2,78 ^{aA}	17,43 \pm 2,61 ^{bA}	10,60 \pm 1,83 ^{aB}
Controle	13,83 \pm 2,00 ^{aA}	11,88 \pm 3,11 ^{cA}	10,26 \pm 2,34 ^{aA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Foi observado que os valores do índice de anisocitose (Rdw), não apresentaram uma diferença significativa entre os grupos tratados com as soluções e o grupo controle no momento da indução e 24 horas após a indução. Após 1 hora os grupos tratados com as soluções de 0%, 60%, 80% e grupo controle diferiram significativamente dos peixes tratados com as soluções de 20%, e 100% de óleo de melaleuca. O grupo tratado com a solução de 40% apresentou o maior valor médio do índice de anisocitose, diferindo significativamente dos grupos expostos às demais soluções 1 hora após a indução (Tabela 16).

Entre o momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução, os peixes submetidos às soluções de 60%, 80% e o grupo controle não apresentaram uma variação significativa. Os grupos tratados com as soluções de 0%, 20%, e 100% tiveram uma redução nos valores médios do índice de anisocitose 24 horas após a indução. O grupo tratado com a solução de 40% apresentou uma redução significativa no valor médio do índice de anisocitose após 24 horas, e em relação ao valor observado 1 hora após a indução.

TABELA 19 - Media (\pm dp) da contagem total de plaquetas (Plt) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle desprovido de anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	24,5 \pm 7,87 ^{bB}	46,6 \pm 5,65 ^{bA}	31,6 \pm 5,56 ^{bB}
20%/80%	32,1 \pm 11,20 ^{bB}	45,1 \pm 15,08 ^{bA}	32,3 \pm 5,83 ^{bB}
40%/60%	43,5 \pm 11,52 ^{aA}	55,3 \pm 17,34 ^{aA}	53,9 \pm 13,65 ^{aA}
60%/40%	25,7 \pm 11,83 ^{bA}	32,0 \pm 9,45 ^{cA}	14,3 \pm 3,43 ^{bB}
80%/20%	26,4 \pm 10,90 ^{bA}	30,6 \pm 19,79 ^{cA}	19,6 \pm 5,75 ^{cA}
100%/0%	40,4 \pm 15,62 ^{aB}	61,3 \pm 25,50 ^{aA}	30,8 \pm 18,19 ^{bB}
Controle	33,1 \pm 10,77 ^{bA}	31,4 \pm 9,47 ^{cA}	21,3 \pm 6,37 ^{cA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Os valores da contagem total de plaquetas (Plt) apresentaram uma diferença significativa entre os grupos tratados com as soluções e o grupo controle durante a indução, de forma que os grupos tratados com as soluções de 40% e 100% diferiram dos demais grupos e do grupo controle.

No tempo de 1 hora após a indução foram observadas três variações significativas dos valores médios da contagem total de plaquetas. Os peixes tratados com as soluções de 0% e 20% diferiram dos grupos expostos às soluções de 60%, 80% e do grupo controle, da mesma forma os grupos tratados com as soluções de 40% e 100%, diferiram dos grupos citados acima.

Após 24 horas, foi observado que os valores médios da contagem total de plaquetas referentes aos grupos tratados com as soluções de 0%, 20% e 100%, diferiram significativamente dos grupos expostos às soluções de 60%, 80% e do grupo controle. Os peixes expostos à solução de 40% diferiram de todos os grupos, 24 horas após o momento da indução (Tabela 17).

Entre o momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução, observou-se que os grupos tratados com as soluções de 40%, 80%, e o grupo controle não diferiram entre o momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução. Já os peixes tratados com as soluções de 0%, e 20 % e 100%, aumentaram os valores médios dos valores médios da contagem total de plaquetas 1 hora após a indução, e voltaram a reduzir após 24 horas. O grupo tratado com a solução de 60% manteve o valor médio da contagem total de plaquetas estável até 1 hora após a indução, e apresentou a maior redução do valor médio da contagem total de plaquetas registrada entre os grupos após 24 horas.

TABELA 20 - Media (\pm dp) da determinação do volume plaquetário médio (Mpv) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle sem anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	8,19 \pm 0,60 ^{bC}	8,71 \pm 0,73 ^{aB}	9,35 \pm 0,52 ^{aA}
20%/80%	8,22 \pm 0,47 ^{bB}	8,95 \pm 0,34 ^{aA}	9,06 \pm 0,61 ^{aA}
40%/60%	8,79 \pm 0,50 ^{aA}	9,09 \pm 0,40 ^{aA}	9,22 \pm 0,33 ^{aA}
60%/40%	8,33 \pm 0,52 ^{bA}	8,13 \pm 0,38 ^{bA}	8,43 \pm 0,70 ^{bA}
80%/20%	8,65 \pm 0,51 ^{aA}	8,51 \pm 0,14 ^{bA}	8,27 \pm 0,36 ^{bA}
100%/0%	8,62 \pm 0,48 ^{aA}	8,76 \pm 0,33 ^{aA}	9,12 \pm 0,46 ^{aA}
Controle	8,77 \pm 0,65 ^{aA}	8,70 \pm 0,40 ^{aA}	8,29 \pm 0,51 ^{bA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

Durante o experimento foi observado que os valores médios do volume plaquetário médio (Mpv), apresentaram uma diferença significativa entre os grupos tratados com as soluções e o grupo controle, durante a indução e 24 horas após a indução. Os peixes tratados com as soluções de 0%, 20% e 60% não diferiram entre si, e apresentaram uma diferença significativa em relação aos grupos expostos as

soluções de 40%, 80%, 100%, e o grupo controle, durante a indução. Após 1 hora somente os grupos tratados com as soluções de 60% e 80%, variaram em relação aos demais grupos e o grupo controle (Tabela 18).

No tempo de 24 horas após a indução os peixes tratados com as soluções de 0%, 20%, 40% e 100% de óleo de melaleuca apresentaram diferença significativa em relação aos grupos tratados com as soluções de 60%, 80% e o grupo controle. Entre o momento de indução, 1 hora e 24 horas após a indução, apenas os grupos tratados com as soluções de 0% e 20% apresentaram uma variação significativa no valor do volume plaquetário médio entre os tempos. Foi observado que os valores aumentaram 1 hora e 24 horas após a indução.

TABELA 21 - Media (\pm dp) do plaquetócrito (Pct) das amostras coletadas em juvenis de tilápia do Nilo submetidos a indução anestésica a uma concentração de 100mg/L de diferentes soluções de óleo de cravo/óleo melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% de óleo de melaleuca, e o grupo controle sem anestésicos. As amostras foram coletadas no momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução.

Soluções	Indução	1 hora	24 horas
0%/100%	0,0278 \pm 0,008 ^{aB}	0,0446 \pm 0,04 ^{aA}	0,0300 \pm 0,03 ^{bB}
20%/80%	0,0312 \pm 0,03 ^{aA}	0,0397 \pm 0,01 ^{aA}	0,0266 \pm 0,009 ^{bA}
40%/60%	0,0380 \pm 0,01 ^{aA}	0,0497 \pm 0,04 ^{aA}	0,0485 \pm 0,04 ^{aA}
60%/40%	0,0215 \pm 0,02 ^{aA}	0,0257 \pm 0,027 ^{bA}	0,0134 \pm 0,003 ^{bA}
80%/20%	0,0223 \pm 0,02 ^{aA}	0,0222 \pm 0,006 ^{bA}	0,0220 \pm 0,01 ^{bA}
100%/0%	0,0343 \pm 0,03 ^{aB}	0,0523 \pm 0,05 ^{aA}	0,0239 \pm 0,02 ^{bB}
Controle	0,0288 \pm 0,02 ^{aA}	0,0265 \pm 0,02 ^{bA}	0,0238 \pm 0,02 ^{bA}

Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,5$) entre as soluções segundo o teste de Scott-Knott.

Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre a indução, 1 hora e 24 horas após a indução ($p < 0,5$) segundo o teste de Scott-Knott.

O valor do plaquetócrito (Pct), não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados com as soluções e o grupo controle durante a indução. Entretanto, 1 hora após a indução os valores do plaquetócrito variaram significativamente, de modo que os peixes tratados com as soluções de 0%, 20%, 40%, e 100% de óleo de

melaleuca diferiram significativamente dos grupos tratados com as soluções de 60%, 80% e do grupo controle (Tabela 19).

Após 24 horas, somente o grupo tratado com a solução de 40% apresentou uma diferença significativa no valor do plaquetócrito, em relação aos demais grupos e o grupo controle. Em relação ao momento da indução, 1 hora e 24 horas após a indução, somente os peixes tratados com as soluções de 0% e 100% apresentaram uma variação significativa. Essa variação se caracterizou pelo aumento do plaquetócrito, no tempo de 1 hora após a indução.

4.1.6 Correlação dos Parâmetros Hematológicos

Ao se analisar as variáveis hematológicas, observou-se uma correlação positiva alta e significativa entre plaquetócrito (Pct) e contagem total de plaquetas (Plt) ($r = 0,83$), e hemoglobina (Hm) e hematócrito (Ht) ($r = 0,8$). O hematócrito (Ht), também teve correlação positiva alta e significativa com o número de eritrócitos (Hem) ($r = 0,83$) (Tabela 20).

TABELA 22 - Coeficiente de correlação de Spearman entre variáveis hematológicas em juvenis de *O. niloticus* após a indução anestésica com soluções compostas com óleo de cravo e óleo melaleuca.

Parâmetros	Hb	Ht	Vcm	Hcm	Chcm	Rdw	Plt	Mpv	Pdw	Pct
Hem	0,69	0,83	-0,44	-0,6	-0,43	-0,49	-0,19	-0,13	-0,13	-0,18
Hb	1	0,8	-0,05	0,08	0,04	-0,02	-0,04	-0,07	0,04	0,04
Ht		1	-0,03	-0,35	-0,52	-0,36	-0,21	-0,19	-0,08	-0,13
Vcm			1	0,52	0,03	0,35	0,06	0,07	0,13	0,11
Hcm				1	0,76	0,71	0,27	0,15	0,23	0,34
Chcm					1	0,59	0,3	0,2	0,18	0,33
Rdw						1	0,4	0,1	0,18	0,39
Plt							1	0,31	0,12	0,83
Mpv								1	0,26	0,29
Pdw									1	0,12
Pct										1

*Valores em negrito indicam correlação significativa.

A hemoglobina corpuscular média (Hcm), apresentou uma correlação alta, positiva e significativa com a concentração de hemoglobina corpuscular média e o índice de anisocitose ($r = 0,76$ e $0,71$). O índice de anisocitose e a concentração de hemoglobina corpuscular média apresentaram uma correlação moderada positiva igual a $0,59$. Estes resultados diferem daqueles observados por Deriggi *et al.*, (2006) que relataram em seu trabalho que as concentrações de íons plasmáticos em tilápia do Nilo não foram afetadas pela exposição ao eugenol, sugerindo que o uso de óleo de cravo ou de seus derivados não ocasiona distúrbios osmorregulatórios em juvenis avançados de tilápia.

O volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média (Hcm) apresentaram uma correlação moderada positiva significativa igual a $0,52$, esse correlação já era esperada uma vez que estes parâmetros estão relacionados. Os parâmetros hematológicos foram influenciados pela concentração de óleo de cravo nas soluções, hipóxia, e o estresse proveniente da irritação causada pelas concentrações de óleo de cravo para o hematócrito.

4.3 INDUÇÃO À ANESTESIA

Neste trabalho, observou-se que os tempos de sedação para cada fase diferiram entre si em relação às proporções de óleo de cravo e óleo de melaleuca nas soluções anestésicas ($p < 0,05$) (Tabela 21).

Os tempos de sedação na fase 1 e 2, de acordo com o teste de Scott-Knott, não apresentaram diferença entre si, com exceção dos grupos tratados com a solução de 100%, que diferiram dos demais grupos nas duas fases. Na fase 3 e 5 de sedação os grupos sedados com as soluções de 0%, 20% e 40%, não apresentaram diferença entre si, e as concentrações de 60% e 80%, foram semelhantes, e diferiram dos outros tempos presentes na fase 3. O grupo tratado com a solução de 100% diferiu de todos os tempos observados no experimento.

TABELA 23. Tempo (segundos) de indução aos estágios de anestesia em juvenis de tilápia do Nilo, (*O. niloticus*), utilizando grupos de peixes tratados com diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca (0%, 20%, 40%, 60%, 80%, e 100% de óleo de melaleuca) a uma concentração de 100 mg/L.

Soluções	Fase 1 (s)	Fase 2 (s)	Fase 3 (s)	Fase 4 (s)	Fase 5 (s)
0%	4,62 ± 1,85 b	5,93 ± 0,45 b	7,23 ± 1,80c	18.11 ± 3,27b	44.14 ± 13,05 c
20%	6,04 ± 2,08 b	12,15 ± 0,76 b	18,25 ± 5,03c	47.86 ± 11,18b	98.07 ± 25,34 c
40%	7,11 ± 1,70 b	14,00 ± 0,25 b	20,89 ± 3,29 c	52.85 ± 10,43b	126.20 ± 26,50 c
60%	7,69 ± 1,82 b	20,04 ± 9,53 b	34,69 ± 8,34b	58.01 ± 8,13b	221.37 ± 81,15 b
80%	10,98 ± 3,75 b	22,77 ± 5,82 b	39,34 ± 5,78b	60.66 ± 9,59 b	292.09 ± 137,93 b
100%	75,44 ± 24,12 a	141, 93 ± 30,10 a	286,23 ± 44,54 a	466.52 ± 97,79 a	1046.77 ± 103,01 a

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

Na fase 4 os grupos tratados com as soluções de 0% a 80%, foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, de forma que a único grupo que diferiu foi o tratado com a solução de 100%. O grupo submetido à solução de 0% (óleo de cravo puro), 20% e 40%, diferiram dos grupos submetidos às soluções de 60%, 80% e 100%. O grupo exposto a solução de 100 % composta por óleo de melaleuca puro, diferiu de todas os outros grupos segundo o teste de Scott-Knott (Figura 7).

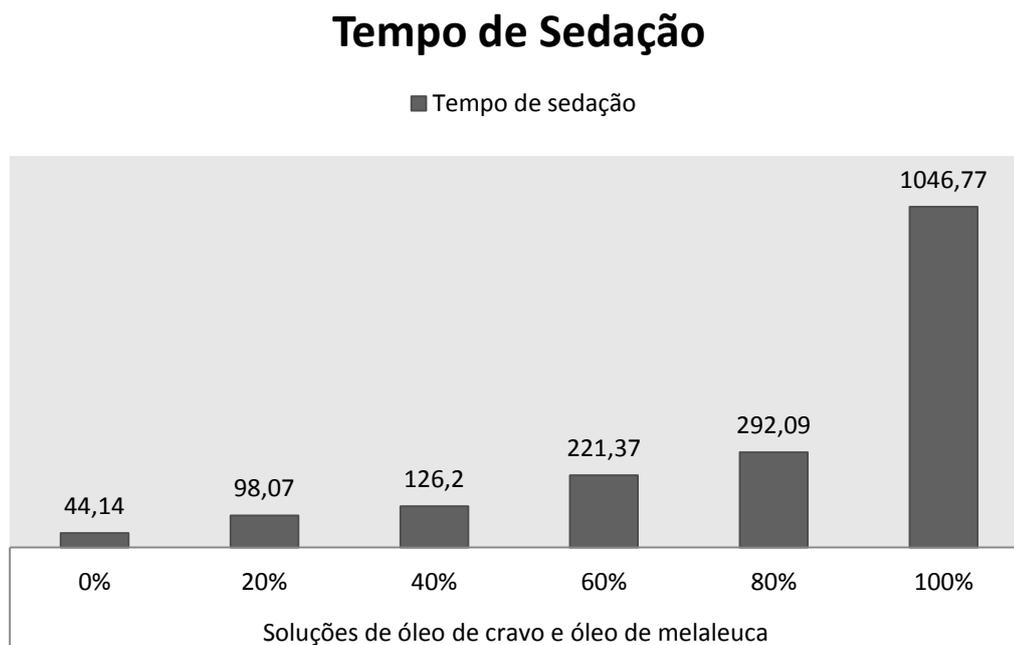


FIGURA 7 – Tempo de sedação para os peixes submetidos às soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% de óleo de melaleuca.

Segundo Marking e Meyer (1985), a indução à anestesia profunda deve apresentar um curto tempo de latência (1 a 3 minutos). O tempo de sedação dos peixes expostos às soluções de 0%, 20%, e 40% esta dentro do intervalo proposto por Marking & Meyer (1985), sendo por isso indicadas para anestesia profunda. A redução do tempo de indução em função do aumento da concentração de óleo de cravo ou eugenol já foram registradas por autores como Soto e Burhanuddin (1995), que induziram exemplares de rabbitfish (*Siganus lineatus*) à anestesia com óleo de cravo, e Cunha e Rosa (2006), que estudaram a ação do eugenol em diferentes espécies de peixes tropicais marinhos.

A concentração que foi usada no experimento encontra-se dentro do intervalo de valores já obtidos para tilápia do Nilo (Delbon, 2006; Vidal *et al.*, 2007) e para outras espécies como o European sea bass, *Dicentrarchus labrax*; o gilthead sea bream, *Sparus aurata* e alevinos de lambari, *Astyanax* sp. (Mylonas *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009). Entretanto, mesmo tendo a capacidade de induzir os animais à anestesia dentro do tempo recomendado pela literatura, as soluções de 0%, 20% e 40%, provocaram nos peixes perda na coloração, irritação, comportamento de tosse, e reflexo de regurgitação. Estas reações podem ser segundo Grush *et al.* (2004) e Vidal *et al.* (2006), atribuídas ao eugenol.

Uma forma de se evitar os efeitos negativos causados pela sedação com óleo de cravo ou eugenol, seria utilizar concentrações mais baixas destes fármacos. Entretanto, estas concentrações podem não sedar os peixes em um menor tempo, o que poderia aumentar o estresse dos animais. O uso do óleo de melaleuca pode reduzir o tempo de sedação sem que agrave as respostas negativas causadas pelo óleo de cravo. Outra opção é o uso de óleo de melaleuca puro, que mesmo podendo ter um custo 2 vezes superior ao do custo do óleo de cravo ao ser adquirido em lojas de produtos naturais e fornecedores especializados, pode ser uma boa opção quando se considera o bem estar dos animais.

Nos grupos tratados com as soluções correspondentes a 60%, 80% e 100% de óleo de melaleuca, não foram registradas reações adversas esperadas para o tempo de sedação. Os tempos de sedação observados para esses grupos não tenham correspondido aos tempos de sedação sugeridos por, Marking e Meyer (1985) e Park *et al.*, (2009a). Os tempos de sedação desses grupos estão de acordo com o tempo máximo de sedação que deve ser de 10 min. (ROSS e ROSS, 2008). No entanto, estudos com adultos de algumas espécies de peixes tropicais como o tambaqui (Roubach *et al.*, 2005) e a tilápia, demonstram que o óleo de cravo é seguro se usado em um tempo de até 30 min. de anestesia.

Os valores observados para os tempos de sedação se encontram dentro do intervalo de segurança proposto por Roubach *et al.*, (2005). Entretanto nos grupos tratados com as soluções de 100% de óleo de melaleuca, os tempos de sedação foram aumentando na medida em que os peixes alcançavam as fases de sedação mais profunda, permanecendo um longo período na fase 4 de sedação. Segundo Park *et al.*, (2009a), para um procedimento de manejo, o estágio mais adequado é o de anestesia profunda, pois neste estágio o peixe fica completamente imóvel.

No decorrer do experimento, o óleo de melaleuca se mostrou inferior ao óleo de cravo em relação aos tempos de indução a sedação, porém o óleo de melaleuca demonstrou ser mais eficiente em minimizar o estresse nos animais durante a sedação. Hajek (2011), em um experimento com carpa comum (*C. carpio*), testando soluções de 0,2 a 0,6 ml/L, observou uma leve agitação nos animais em função do anestésico. Os animais apresentaram resistência à anestesia profunda. Alguns ficaram expostos por até 60 minutos.

Embora o óleo de melaleuca não possua o mesmo poder de sedação que óleo de cravo, ele apresenta uma margem de segurança maior para os peixes, o que torna a sua utilização apropriada quando se busca induzir os animais a níveis de sedação mais profundos.

4.4 RECUPERAÇÃO

Houve efeito significativo da composição da solução anestésica sobre o tempo de recuperação. Quando as médias do teste estatístico de cada grupo foram comparadas, pelo teste Skott-Knott houve uma diferença significativa ($P < 0,05$). As variações nos tempos de recuperação ocorreram de acordo com o tempo de sedação para os peixes tratados com as soluções que possuíam óleo de cravo. O grupo tratado com a solução de 100% contendo óleo de melaleuca puro, não obedeceu a esse parâmetro, e o tempo de recuperação foi inversamente proporcional ao tempo de sedação (Tabela 22).

TABELA 24 - Tempo (segundos) das fases de recuperação em juvenis de tilápia do Nilo, (*O. niloticus*), utilizando grupos de peixes tratados com diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca com uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, e 100% de óleo de melaleuca a uma concentração de 100 mg/L.

Soluções de óleo cravo e óleo melaleuca.	Fase 1 (s)	Fase 2 (s)	Fase 3 (s)	Fase 4 (s)
0%	63,68 ± 4,40s ^c	144,76 ± 26,09s ^c	236,25 ± 11,57s ^c	340,16 ± 27,60s ^d
20%	125,23 ± 28,96s ^b	214,95 ± 25,58s ^b	332,37 ± 33,28s ^b	482,51 ± 60,94s ^c
40%	161,21 ± 21,93s ^a	300,26 ± 54,52s ^a	535,09 ± 25,07s ^a	674,16 ± 67,12s ^b
60%	114,59 ± 21,62s ^b	224,10 ± 35,20s ^b	325,21 ± 17,63s ^b	603,34 ± 68,89s ^b
80%	104,51 ± 14,98s ^b	300,65 ± 79,93s ^a	505,02 ± 68,94s ^a	854,29 ± 217,30s ^a
100%	42,84 ± 17,60s ^d	113,86 ± 19,74s ^c	153,66 ± 24,93s ^d	209,61 ± 31,16s ^e

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas, indicam diferença significativa pelo Teste de Scott-Knott (P<0,05) entre as soluções.

Os peixes tratados com as soluções de 0% composta somente por óleo de cravo demonstraram um tempo de recuperação diferente do tempo de recuperação observado para os animais tratados com as demais soluções em quase todas as fases. Na fase 2 o tempo de recuperação não demonstrou diferença significativa ao tempo de recuperação dos peixes tratados com a solução de 100%. O grupo tratado com a solução de 20% de óleo de melaleuca não apresentou em seu tempo de recuperação uma diferença significativa em relação aos peixes submetidos às soluções de 60% e 80% na fase 1. Entretanto nas fases 2 e 3, a ausência de diferença significativa nos tempos de recuperação, só foi percebida para os peixes tratados com a concentração de 60%, e o seu tempo de recuperação diferiu de todos os grupos na fase 4.

O tempo de recuperação dos peixes sedados com a solução de 40% de óleo de melaleuca na fase 1 diferiu do tempo de recuperação de todos os grupos nessa fase. No entanto, nas fases 2 e 3 o grupo tratado com a solução de 40% não apresentou diferença significativa em relação aos tempos observados para o grupo tratado com a solução de 80%. Na fase 4 o tempo de recuperação do grupo tratado com a solução de 40% não diferiu daquele observado para os peixes tratados com a solução de 60%.

Os peixes submetidos à solução de 80% diferiram de todos os grupos na fase 4, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo tratado com a solução de 40% nas fases 2 e 3, e do grupo tratado com a solução de 60% na fase 1. Os peixes submetidos à solução de 100% de óleo de melaleuca puro não apresentaram diferença significativa em relação aos animais sedados com a solução de 0% (óleo de cravo puro) na fase 2, mas diferiram dos demais grupos, e das demais fases.

Embora os tempos observados em algumas fases não tenham apresentado uma diferença significativa de acordo com o teste de Scott-knott, observou-se que, de um modo geral, o tempo de recuperação aumentou em função do tempo de exposição dos animais às soluções. Quanto maior o tempo para alcançar o nível 5 de sedação, maior o tempo de recuperação (Figura 11). Essa relação não foi observada para os animais expostos ao óleo de melaleuca, pois foi o grupo com o maior tempo de sedação e o menor tempo de recuperação.

Tempo de Recuperação

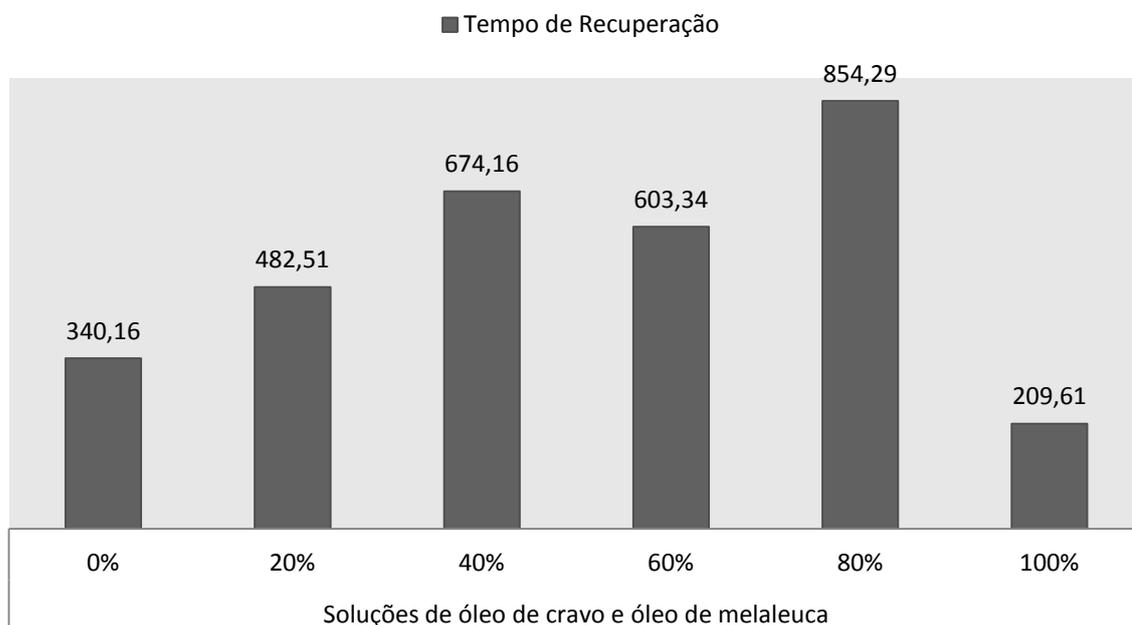


FIGURA 8- Tempo de recuperação para os peixes submetidos às soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca a uma proporção de 0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% de óleo de melaleuca.

4.4.1 Correlação Entre as Fases de Sedação e Fases de Recuperação

Os tempos de sedação e os tempos de recuperação tiveram uma correlação alta positiva e significativa. Esta correlação entre as fases de sedação pode estar relacionada ao aumento progressivo dos tempos de sedação entre as fases, na medida em que os animais alcançavam os estágios de anestesia. Os peixes tratados com as soluções com maior concentração de óleo de cravo tiveram um menor tempo de sedação, e os intervalos de tempo entre as fases foram proporcionais entre si. Na medida em que se avançava para as fases de sedação profunda, os tempos de sedação aumentavam proporcionalmente (Tabela 23).

TABELA 23 - Coeficiente de correlação de Spearman entre variáveis de tempo para sedação e recuperação em juvenis de após a indução anestésica com composto misto de óleo de cravo e óleo melaleuca.

Tempos									
/Fases	Sed/ 1	Sed/ 2	Sed/ 3	Sed/ 4	Sed/ 5	Rec/ 4	Rec/ 3	Rec/ 2	Rec/ 1
Sed/ 1	1	0,93	0,95	0,96	0,9	0,19	-0,48	-0,54	-0,51
Sed/ 2		1	0,95	0,95	0,93	0,17	-0,48	-0,54	-0,51
Sed/ 3			1	0,98	0,96	0,17	-0,49	-0,56	-0,53
Sed/ 4				1	0,93	0,16	-0,48	-0,54	-0,53
Sed/ 5					1	0,16	-0,43	-0,49	-0,44
Rec/ 4						1	-0,33	-0,31	-0,35
Rec/ 3							1	0,89	0,92
Rec/ 2								1	0,88
Rec/ 1									1

*Valores em negrito indicam correlação significativa.

Em relação à recuperação houve uma correlação alta e positiva significativa entre as fases 1,2 e 3, devido ao fato dos animais apresentarem um aumento proporcional do tempo de recuperação, em relação às fases de recuperação. Entretanto, a fase 4 de recuperação quando o animal retomava a capacidade normal de nado, apresentou uma baixa correlação positiva significativa com as outras fases de recuperação. Esse fato pode ser explicado pelo tempo de permanência dos animais na fase 3 de recuperação, que foi menor proporcionalmente as outras fases de recuperação.

A correlação das fases de recuperação e fases de sedação foi moderada e negativa para as fases 1,2 e 3 de recuperação. Esse resultado pode estar relacionado ao tempo de anestesia observado em cada solução. Quanto menor o tempo de indução à anestesia, maior é o tempo de recuperação dos peixes (Park *et al.*, 2008). Neste trabalho foi observado que os animais expostos às soluções com maior concentração de óleo de cravo tiveram um menor tempo de sedação, e apresentaram um maior tempo de recuperação. Entretanto quando se observou as soluções de 0% e 100%, os tempos de recuperação foram inferiores aos tempos das soluções de 20%, 40%, 60% e 80%.

Como foram testadas diferentes soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca, acredita-se que o tempo de recuperação e indução tenha sido influenciado pela concentração de óleo de cravo nas soluções. O óleo de melaleuca aparentemente não possui o mesmo potencial que o óleo de cravo em relação à

capacidade de sedação, porém os animais expostos ao óleo de melaleuca apresentam um menor tempo de recuperação. Hajek, (2011) observou que os tempos de indução não influenciaram nos tempos de recuperação de modo que não variaram de forma significativa. Para um melhor detalhamento do potencial do óleo de melaleuca como anestésico são necessários mais estudos com concentrações diferentes.

Os parâmetros hematológicos foram influenciados pela concentração de óleo de cravo nas soluções, hipóxia, e o estresse proveniente da irritação causada pelas concentrações de óleo de cravo presentes na solução. Para que se tenha uma melhor compreensão das alterações dos parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo em função da sedação com diferentes combinações de óleo de cravo e óleo de melaleuca, é necessário a realização de estudos mais detalhados, que avalie um número maior de concentrações, e o plasma sanguíneo dos animais.

Ainda são necessários mais estudos para determinar os níveis de segurança do óleo de melaleuca, mas para atividades como manejos e coleta de sangue, ele pode ser usado sem que agrida os animais e altere significativamente seus parâmetros hematológicos. Embora o óleo de melaleuca não seja tão eficiente em imobilizar os peixes por um longo tempo, é preciso considerar a sua capacidade de reduzir o estresse nos animais. O óleo de melaleuca não provocou reações negativas nos peixes e possibilitou uma rápida recuperação. Com isso apresenta-se como excelente opção para sedação em transporte, uma vez que sejam ministradas as doses correspondentes às fases de sedação desejadas para o manejo.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir, para tilápias do Nilo, submetidas às condições e presente experimento, que: as soluções de óleo de cravo e óleo de melaleuca testadas foram capazes de induzir os peixes aos estágios de anestesia, e apresentaram um menor tempo de sedação em relação à proporção de óleo de cravo nas soluções. As concentrações com maior proporção de óleo de cravo tiveram um maior poder de sedação, mas submeteram os animais a reações como hiperatividade, hiperventilação, tosse e reflexo de regurgitação. O óleo de melaleuca em maior proporção nas soluções não causou efeitos negativos perceptíveis nos animais.

Os parâmetros hematológicos indicaram uma possível ocorrência de distúrbios osmorregulatórios, que podem ocorrer em animais expostos ao óleo de cravo. Essas alterações não foram significativas nos animais expostos à solução de 100% (óleo de melaleuca puro). O óleo de melaleuca pode ser usado em associação com óleo de cravo com o objetivo de amenizar os efeitos negativos causados pelo óleo de cravo puro. De acordo com os dados coletados no experimento, dentre todas as soluções testadas, a solução de 80% é a mais indicada para sedação de tilápia do Nilo. A solução de 80% apresentou um pequeno tempo de sedação e o seu tempo de recuperação esteve dentro da margem tolerável para sedação em peixes. Também não foi observado nenhum efeito negativo nos animais durante a indução anestésica.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ACERETE, L.; BALASCH, J. C. ESPINOSA, E. JOSA, A. TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1-4, p.167-178, 2004.
- AFFONSO, E.G. *et al.* Blood parameters and metabolites in the teleost fish (*Colossoma macropomum*) exposed to sulfide or hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 133, p. 375- 382, 2002.
- ALTMAN, P. M. Australian tea tree oil – a natural antiseptic. **Aust. J. Biotech.**, v. 3, n. 4, p. 247-248, 1989.
- ANZILIERO, D. KREUTZ, C.L. BARCELLOS, G.J.L. Avaliação de quatro diferentes anestésicos para sua utilização no manejo de jundiás (*Rhamdia quelen*). **Anais... COMBRAVE**, 2008.
- ARENDS, R.J. MANCERA, J.M. MUÑOZ, J.L. WENDELAAR BONGA, S.E. FLIK, G. The stress response of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) to air exposure and confinement. **Journal of Endocrinology**, v. 163, p. 149-157, 1999.
- BARBOSA, L. M. G. *et al.* Respostas metabólicas do matrinxã (*Brycon amazonicus*) submetido a banhos anestésicos de eugenol. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 29, n. 3, p. 255-260, 2007.
- BARCELLOS, L.J.G. *et al.* Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in (*Rhamdia quelen*) (Quoy e Gaimard), a South American catfish. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 32, p. 121-123, 2001.
- BARCELLOS, L.J.G. *et al.* Hematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy e Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 34, p. 1465-1469, 2003.
- BARCELLOS, L.J.G. *et al.* Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 229-236, 2004.
- BARTON, B.A. IWAMA, G.K. . Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Reviews of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. *In*: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. 1997, p.1-33.

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000.

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.

BASTOS-RAMOS, W. P. GONÇALVES, N. M. F. M.; BACILA, M. Anesthetic and analgesia in Antarctic fish na experimental approach. **Archeives of Veterinary science**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 95-100, 1998.

F. BITTENCOURT , B.E. SOUZA, W.R. BOSCOLO , R.R. RORATO , A. FEIDEN , D.H. NEU. Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*) [Benzocaine and eugenol as anesthetics for golden fish (*Carassius auratus*)]**Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.6, p.1597-1602, 2012.

BOLASINA, S.N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, (*Urophycis brasiliensis*) (*Pisces, Phycidae*) subjected to anesthetic treatment. **Aquaculture International**, London, v.14 n.6, p. 569–575, 2006.

BOOTH, N. H. Drug and chemical residues in the edible tissues of animals. In: BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. (Eds.). **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 6th ed. Iowa State Univ. Press, Iowa, 1988, p. 1149-1159.

BRANDÃO , F. R. GOMES , L. C. CHAGAS , E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.

BURKA, J.F. HAMMELL, K.L. HORSBERG, T.E. et al. Drugs in salmonid aquaculture. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.20, p.333-349, 1997.

CAMPO, L. F. C. **La Tilapia Roja: una evolucion de 26 años, de la incertidumbre al exito**. México, 147 p. 2008.

CARMICHEL, G. J. TOMASSO, J. R. SCHWEDLER, T. E. Fish transportation. In: WEDEMEYER, G. A. (Ed.). **Fish hatchery management**. 2nd ed. Bethesda: American Fisheries Society, 2001. p. 641-660.

CARNEIRO, P. C. F. KAISELER, P. H. S. SWAROFISKY, E. A. C. BALDISSEROTTO, B. Transport of jundiá (*Rhamdia quelen*) juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 283-288, 2009.

CARNEIRO, P.C.F. URBINATI, E.C. Ionic imbalance in matrinxã, (*Brycon cephalus*) (Teleostei: Characidae), submitted to different hauling densities. **Aquac. Intern.**, Netherlands, v. 10, p. 221-229, 2002.

CARNEIRO, P.C.F. *et al.* Effect of sodium chloride on physiological responses and the gill parasite, (*Piscinoodinium*) sp., in matrinxã, (*Brycon cephalus*), (Teleostei: Characidae) subjected to transport stress. **J. Aquac. Trop.**, New Delhi, **Acta Sci. Anim. Sci.** Maringá, v. 28, n. 4, p. 469-475, Oct./Dec., 2006 v. 17, p. 337-348, 2002a.

CARNEIRO, P.C.F. URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã (*Brycon cephalus*) (Günther), during transport. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 32, p. 297-304, 2001.

CASTAGNOLLI, N. **Aquicultura para o ano 2000**. Brasília: CNPq, 95 p., 1996.

CAMPOS, C. E. ARAÚJO L. D. , BOIJINK, C. L. INOUE, L. A. K. A., GOMES, L. C. G, MORAES, F. R. Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com b-glucano. **Biotemas**, v.25 n.4, p.221-227, dezembro de 2012.

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, v.86 p. 225-250.

CHO, G. K. HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Walbaum). **Aquaculture Research**, Berlin, v. 31, n. 6, p. 537-546, 2000.

CLEARWATER, S.J. PANKHURST, N.W. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. **Journal of Fish Biology**, v.50 p.429-441, 1997.

CYRINO, J. E. CONTE, L. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO E ELISABETH CRISCUOLO URBINATI (Eds.). **AquaCiência: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, cap.12, 2006 p. 151-171.

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.

COTTER, P.A. RODNICK, K.J. Differential effects of anesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, n. 145, p. 158-165, 2006.

CUNHA *et al.* Níveis de cortisol em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao óleo de cravo Eugenol e extrato de Condalia Buxifolia. In: AQUACIENCIA 2006, 2006.

BENTO GONÇALVES. **Anais...** Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2006. CD-Rom.

CUNHA, M.A. da. **Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas.** 2007. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Produção Animal, Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

CUNHA, M. A. ZEPPENFELD, 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.

DELBON, M. C. E. PAIVA, M. J. T. R. Eugenol em juvenis de tilápia do Nilo: concentrações e administrações sucessivas. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 43-52, 2012.

DELBON, M.C. **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) 2006. Disponível em: < www.caunesp.unesp.br > acesso em 21 de março de 2014.

DERIGGI, G. F. *et al.* Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 28, p. 269-274, 2006.

DE SOUSA D.P. NOBREGA F.F. DE MORAIS L.C. DE ALMEIDA R.N. Evaluation of the anticonvulsant activity of terpinen- 4-ol. **Zeitschrift f'r Naturforschung C.** v. 64, p.1-5, 2009.

DUNLOP, R. e LAMING, P. Mechanoreceptive and nociceptive responses In: the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Pain, Seattle**, n.6, v.9, 2005, p.561-568.

ENDO, T. OGIHIMA, K. TANAKA, H. OSHIMA, S. Studies on the anesthetic effect of eugenol in some freshwater fishes. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 38, p. 761-767, 1972.

FAÇANHA, M.F. GOMES, L.C. A eficácia do mentol como anestésico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v.35, n.1, p.71-75, 2005.

FAGUNDES, M. URBINATI, E. C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 276, n. 1-4, p. 112-119, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FishStat Plus**: universal software for fishery statistical time series. Version 2.32., 2007.

FAO. **The state of world's fisheries and aquaculture 2002**. FAO information division. Rome, 2003. Disponível em: <[http:// www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm](http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm)>. Acesso em 12 de Março de 2014.

FRISCH, A. J. ULSTRUP, K. E. HOBBS, J. P. A. The effects of clove oil on coral: An experimental evaluation using (*Pocillopora damicornis*) (Linnaeus). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 345, n. 2, p. 101-109, 2007.

GILDERHUS, P.A. MARKING, L.L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, Bethesda, v.7, p.288- 292, 1987.

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

GOMES L. C. ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M; ROUBACH, R. URBINATI, E. C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V.38, n.2, p. 110-116, 2003a.

GOMES, L.C. *et al.* Transport of pirarucu (*Arapaima gigas*) juveniles in plastic bag. **Acta Amazônica, Manaus**, v. 33, p. 637-642, 2003b.

GOMES, L.C. *et al.* Effect of fish density on the stress physiological responses and mortality of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) during transportation. **J. World Aquacult. Soc.**, Baton Rouge, v. 34, p. 76-84, 2003c.

GOMES, L. C. ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. CHIPPARI-GOMES, A. R. ROUBACH, R. Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a closed system. **Brazilian Journal of Biology**. v.66, n.2, p. 374-384, 2006.

GONCALVES, A.F.N. SANTOS, E.C.C. FERNANDES, J.B.K. TAKAHASHI, L.S. 2008 Mentol e eugenol como substitutos da benzocaina na inducao anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiaru Animal Sciences**, Maringa, v.30, n.3, p.339-344.

GREAY, S.J. IRELAND, D.J. KISSICK, H.T. LEVYA., BEILHARZ, M.W. RILEY, T.V. e CARSON C.F. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** v.65, n.877, p.888, 2010.

GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an anesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1453-1464, 2000.

GROTTUM, J.A. STAURNES, M. SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. **Aquaculture Research**, v.28, n.2, p.159-164, 1997.

GRUSH, J. NOAKES, D.L.G. MOCCIA, R.D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, danio rerio. **Zebrafish**, New Rochelle, v.1, n.1, p.46 – 53, 2004.

GUÉNETTE, S. A. UHLAND, F. C. HÉLIE, P. BEAUDRY, F. VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, n.1-4, p. 262-265, 2007.

HAJEK G.J., KZYSZEJKO B. & DZIAMAN R. (2006) The anaesthetic effect of clove oil on common carp, (*Cyprinus carpio*) L. **Acta Ichthyologica et Piscatoria** v.36, n.93, p.97, 2006.

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.

HEAVNER, J.E., **Animal models and methods in anaesthesia research**, in: Gay William I. (Ed.), *Methods in Animal Experimentation*, volume 6, Academic Press, New York, 1981, 400p.

HISANO, H. ISHIKAWA, M.M. FERREIRA, R.de A. BULGARELLI, A. L.A. COSTA, T. R. PÁDUA, S. B. de. **Óleo de cravo como anestésico para juvenis de dourado**. Trabalho apresentado no I Congresso Brasileiro de Peixes de Água Doce-MS, 2007.

HISANO, H. *et al.* Tempo de indução e de recuperação de dourados (*Salminus brasiliensis*) (Cuvier, 1816) submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia sp.*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, p. 303-307, 2008.

HONCZARYK, A. INOUE, L.A.K.A. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, mar-abr, 2009.

HOSKENEN, P. PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia for Crucian carp (*Carassius carassius*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.37, n.2, p.132-135, 2010.

HOUSTON, A.H. DOBRIC, N. KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.15, p.339-347, 1996.

HSEU, J.R. YEH, S.L. CHUY, T. e TINGY, Y. Comparison of efficacy of clove anesthetics in goldlined sea bream, *Sparus sarba*. **Acta Zoologica Taiwanica** v.9, n.35, p.41, 1998.

IDE, L.M. *et al.* The role of olfaction in the behavioral and physiological responses to conspecific skin extract in a teleost fish, (*Brycon cephalus*). **J. Fish Biol.**, London, v. 63, p. 332–343, 2003.

IVERSEN, M. *et al.* Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. **Aquaculture, Amsterdam**, v. 168, p. 387-394, 1998.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, aquis and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture, Amsterdam**, v. 221, p. 549-566, 2003.

INOUE, L. A. K. A. SANTOS-NETO, C. MORAES, G. Benzocaína como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Boletim Técnico do Cepta**, v.15, p.23-30, 2002.

INOUE, L. A. K. A. NETO, C. S. MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

INOUE, L. A. K. A. *et al.* Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v. 35, n.2, p.289-295, 2005.

INOUE, L.A.K.A. MORAES, G. Stress responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) submitted to transport in plastic bags. **J. Fish. Aquat. Sci.**, Washington, D.C., v. 1, n.1, p. 1-9, 2006.

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.

IWANA, G. e ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P. e MOMMSEN, T. P. *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes*. Amsterdam: **Elsevier Science**, 1994, v.3, n.1, p. 1-5.

IWAMA, G. AFONSO, L. MATHILAKATH, V. Stress in fish. Campbell River: **Aqua Net Workshop on Fish Welfare**, 2004. 278 p.

KEENE, J.I. NOAKES, D.I.G. MOCCIA, R.D. et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89-101, 1998.

KING, W.V. HOOPER, B. HILLSGROVE, S. BENTON, C. BERLINSKY, D. 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**, p.1- 8, 2005.

Kruger-Azolini, M.H. Carosfeld, J. Delattre, E. Ceccarelli, P.S. Determinação dos indicadores endócrinos e metabólicos no estresse no manejo em pacu juvenil, *Piaractus mesopotamicus* Homlberg, **Boletim Técnico do CEPTA**, v.2, p.35-42, 1989.

KUBTIZA, F. Transporte de peixes vivos. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 20 – 26, 1997.

KUBITZA, F. Técnicas de transporte de peixes vivos. **Panorama da Aquicultura** Campo Grande: Conceito, 1998. 44 p.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial, **Panorama da Aquicultura** Jundiaí: (s.n.), 2000.

KUBITZA, F. Tilápias na bola de Cristal, **Panorama da Aquicultura**, janeiro/fevereiro, v. 17, n 99, 2007.

LAMBOOIJ B. PILARCZYK M. BIALOWASH. REIMERT H.G.M. ANDRE. G. & VAN DE VIS H. Anaesthetic properties of propiscin (Etomidat) and 2-phenoxyethanol in: the common carp (*Cyprinus carpio* L.), neural and behavioural measures. **Aquaculture Research**, 2009, v.40, p.1328 –1333.

LAPEMM – Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica. **Histoquímica do cravo**. Disponível em: <<http://www.lapemm.ufba.br/cravo.htm>>. Acesso em 12 de Março de 2014.

LINKONGWE, J. S. STECKO, T. D. STAUFFER, Jr, J. R. CARLINE, R. F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linneaus). **Aquaculture**, p. 37- 46, 1996.

HOSHIBA, M. A. GONÇALVES, F. D. URBINATI, C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazonica** v. 39, n.2, p. 445 – 452, 2009.

McDONALD, G. MILLIGAN, C.L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G. W. Pickering, A. D. Sumpter, J.P. Schreck, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, 1997 p. 119-144.

MOMMSEN, T. P. VIJAYAN, M. M. MOON, T. W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 9, n. 3, p. 211- 268, 1999.

MUNDAY, P.L. WILSON, S.K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in: anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. **J. Fish Biol.**, Oxford, 1997, v. 51, n. 5, p. 931-938.

MARKING, L. L. MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries. **Fisheries**, v. 10, n. 6, p. 2-5, 1985.

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

MOHAMED S.J. Comparative efficacy of four anesthetics on common carp *Cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyologica et Piscatoria** v.29, n.91, p.97, 2007.

MORGAN, J.D. IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.W. PICKERING, A.D. SUMPTER, J.P. SCHRECK, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, 1997, p. 247-270.

MILLIGAN, C.L. HOOKE, G.B. JOHNSON, C. Sustained swimming at low velocity following a bout of exhaustive exercises enhances metabolic recovery in rainbow trout. **Journal of the Experimental Biology**, v.203, p. 921-926, 2000.

OLIVEIRA, J. R. **Sobrevivência de alevinos e juvenis de tilápia, (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, sob a ação do cloreto de sódio, benzocaína e óleo-de-cravo-da-índia para transporte**, 2007 Dissertação de (Mestrado), Jaboticabal: UNESP, 2007.

OKAMOTO, M.H. TESSER, M.B. LOUZADA, L.R. SANTOS, R.A. dos SAMPAIO, L.A. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo (*Trachinotus marginatus*). **Ciência Rural Online**, Santa Maria, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008005000100&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 12 de Março de 2014.

OKAMURA, D. ARAÚJO F. G. ROSA, P. V. FREITAS, R. T. F. MURGAS, L. D. S. CESAR, M. P. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. **R. Bras. Zootec.**, v.39, n.5, p.971-976, 2010.

ONO, E. A. KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanques-rede**. 3ªed. Jundiaí: Eduardo A. Ono. 112p. 2003.

Ostrenskys, A. Borghetti, J. R. Soto, D. **Aquicultura no Brasil: O desafio de crescer**. Brasília: SEAP 2008.

PACHECO, J. T. C. **Efeito Da Temperatura Da Água E Da Sedação Com Eugenol Na Sobrevida Do Plati (*Xiphophorus maculatus* Günther)** Goiânia – GO 2009.

PÁDUA, S.B. *et al.* Valores para o leucograma e trombograma de Juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*) em condições experimentais de cultivo, **Revista Brasileira de Medicina veterinária**, v. 31, n. 4, p. 282-287, 2009.

PALIC, 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 36 minnows (*Pimephales promelas Rafinesque*). **Aquaculture**, v. 254, p. 675-685, 2006.

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, V.39, P. 877-884.

PAULA, C. **Efeito Do Eugenol Na Sobrevida De Lambaris (*Astyanax* sp) Em Diferentes Concentrações E Temperaturas**. Goiânia - GO 2009

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 Santa Maria Online**. Junho, 2009.

PIRHONEN, J. SCHRECK, C.B. Effects of anesthesia with MS 222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 220, n. 1- 4, p. 507- 514, 2003.

PIPER, R. G. McELVAIN, I. B. ORME, E. McCRAREN, J. P. FOWLER, L. G. LEONARD, J. **Fish Hatchery Management**. US Fish and Wildlife Service, Washington, D. C., 1982.

PROENÇA, C.E.M. BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de Piscicultura Tropical**. Brasília: IBAMA. 196 p. 1994.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2014

REZENDE, F. P. VIANNA, R. A. LANNA, E. A. T. Uso de óleos essenciais de cravo-da-índia, melaleuca, eucalipto e menta na sedação de peixe. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 5; 2012, Palmas. Unir, consolidar e avançar: **Anais**. Palmas: AQUABIO, 2012. 1 CD-ROM. Organizado por: Sílvio Ricardo Maurano; AQUACIÊNCIA 2012.

ROCHA, R.M. *et al.* Physiological responses associa Ted with capture and crowding stress in matrinxã (*Brycon cephalus*) (Gunther, 1869). **Aquac. Res.**, Oxford, v. 35, p. 245-249, 2004.

ROBERTSON, L. THOMAS, P. ARNOLD, C. R. Plasma cortisol and the secondary responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. **Aquaculture**, v. 68, p. 115-130, 1988.

Ross, L.G. Ross, B. **Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Blackwell Science, Oxford, UK 1999.

ROSS, L.G. ROSS B. Book Reviews: Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. **Journal of fish biology**, v.56, p.1562-1565, 2000.

ROSS, L.G. e ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3a ed. Oxford: **Blackwell Science**, 2008, 236p.

ROUBACH, R. GOMES, L.C. LOURENÇO, J.N.P. FONSECA, F.A.L. SANTOS, P.J.O. VAL, A.L. Efficacy of eugenol as an anesthetic in juvenile tambaqui, (*Colossoma macropomum*). International Congress on biology of fishes. Tropical fish: news and news, Vancouver, **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.38, n1, p.93-96.43 – 52, 2012

ROUBACH, R. GOMES, L.C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**. Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 37 – 40, 2001.

RUSSEL, M. SOUTHWELL, I. **Phytochemistry**, 2002, v.59, p.709.

SCHRECK, C.B. Accumulation and long-term effects os stress in fishes. In: Moberg G.P. Manch, J.A. (Eds.) **The Biology of Animal Stress**. CAB International, 2000, p. 147–158.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v1, p. 1383-1392, 1950.

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 brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.62, n.3, p. 337-342, 2001.

SMALL, B. C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to three stressors. **Aquaculture**, v. 238, p. 469-481, 2004.

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

SNEDDON, L.U. The evidence for pain in fish: the use of morphine as na analgesic. **Applied Animal Behaviour Science**, Vancouver, v.83, p. 153-162, 2003.

SOTO, C. BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, p. 149-152, 1995.

SOUZA JUNIOR, V.B. ALVES JUNIOR, T. T. A eficácia do óleo de cravo (eugenol) como anestésico no manejo de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*, mantidos em cativeiro. In: AQUACIENCIA 2006, 2006. Bento Gonçalves. **Anais... Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, 2006, CD-Rom.

SOUZA, M. L. R. de MARANHÃO, T. C. F. Rendimento da carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (L.), em função do peso corporal. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 897-901, 2001.

STAURNES, M. *et al.* Physiological effects of simulated high-density transporto f Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v. 119, p.381-391, 1994.

SUMMERFELT, R.C. e SMITH, L.S. Anaesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C.B. e MOYLE, P.B. **Methods for Fish Biology**. **American Fisheries Society**, Bethesda, MD. 1990, p.213 - 272.

SYLVESTER, J.R. Factors influencing the efficacy of MS- 222 to striped mullet (*Mugil cephalus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 163-169, 1975.

TAKAHASHI, L. S. ABREU, J. S. BILLER, J. D. URBINATI, E. C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 469-475, 2006.

TYTLER, P. HAWKINS, A. D. Vivisection, anaesthetics and minor surgery. In: Hawkins, A. D. (Editor). **Aquarium Systems**. Academic Press, New York, NY, 1981, p. 247-278.

TORT, L. et al. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Res.** Oxford, v. 33, p. 907 - 910, 2002.

TSANTILAS H. et al. Eugenol as a efficacious anaesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier). **Aquaculture Research**, Oxon, v.36, n. 11, p.1056-1061, 2005.

TSANTILAS H. et al. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of White sea bream, *Diplodus sargus* L., and Sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. **Aquacultures**, v. 253, p. 64-70, 2006.

UETA, K. SUZUKI, T. SUGIMOTO, M. UCHIDA, I. MASHIMO, T. Local anesthetics have different mechanisms and sites of action at recombinant 5-HT₃ receptors. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Schaumburg, v.32, p. 462 – 470, 2007.

URBINATI, E.C. CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P. et al. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt; **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, 2004. p. 171-194.

URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P, **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. 1. ed. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2005, p. 171 – 194.

URBINATI, E. C. CARNEIRO, P. C. F. Sodium chloride added to transport water and physiological responses of Matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Teleost: Characidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 4, p. 569-572, 2006.

VELISEK J. & SVOBODOVA Z. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. **Acta Veterinaria Brno** v.73, p.247- 252, 2004.

VELISEK, J. SVOBODOVA, Z. PIACHOCA, V. GROCH, L. NEPEJCHAOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.) **Veterinary Medicine**, v. 50, p. 269-275, 2005.

VELISEK, J. WLASOW, T. GOMULKA, P. SVOBODOVÁ, Z. L. NOVOTN, L. ZIOMEK, E. Effects of Clove Oil Anaesthesia on European Catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, p. 99-106, 2006.

VIDAL, L.V.O. ALBINATI, R.C.B. ALBINATI, A.C.L. DE MACÊDO, G.R. Utilização do Eugenol como Anestésico para o Manejo de Juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 275 - 279, 2006.

VIDAL, L.V.O. ALBINATI, R.C.B. SANTOS NETO, E. B. DEUS, B.T. ALBINATI, A. C. L. Influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) à ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 212-216, 2007a.

VIDAL, L. V.O. FURUYA, W.M. GRACIANO, T. S. SCHAMBER, C.R. SANTOS, L.D. dos SOARES, C. M. Concentrações de Eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 29, n. 4, p. 357-362, 2007b.

VIDAL, L.V.O. ALBINATI, R.C.B. ALBINATI, A.C.L. LIRA A.D. ALMEIDA, T.R. SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p. 1069-1074, 2008.

YANG, B.H. et al. Activation of vanilloid receptor 1(VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003.

WAGNER, G. et al. The ability of clove oil and MS 222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). **Aquaculture Res.** Oxford, v. 34, p. 1139- 1146, 2003.

WATANABE, W.O. LOSORDO, T.M. FITZSIMMONS, K. HANLEY, F. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trend and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, p.465- 498, 2002.

WATERSTRAT, P. Induction and recovery from anesthesia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fingerlings exposed to clove oil. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, p. 250-255, 1999.

WEYLO., KAISER H. & HECHTT. On the efficacy and mode of action of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, (*Carassius auratus*), at different temperatures and concentrations. **Aquaculture Research**, v. 27, p.757–764, 1996.

WELLS, R.M.G. PANKHURST, N.W. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as a stress indicator in fish. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.30, p. 276-284, 1999.

WEBER, R. A. PELETEIRO, J. B. GARCIA MARTIN, L. O. ALDEGUNDE, M. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic

agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v. 288, n. 1-2, p. 147-150, 2009.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p 591-625, 1997.

WOODY, C. A. NELSON, J. RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.

ZAHL, I, H. ET AL. Anaesthesia of Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*)-effect of pré-anaesthetic sedation, and importance of body weight and water temperature. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1235-1245, 2011.

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 body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v.295, p. 52 – 59, 2009.

ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das chitraladas no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v,10, n.60, p.15-19, 2000.

ZIMMERMANN, S. FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: José Eurico Posseibon Cyrino, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Débora Machado Fracalosi, Newton Castagnolli (Editores), **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo: TecArt, Cap.9, 2004 p. 239-266.