



RAQUEL DE ANDRADE MELLO

**AVALIAÇÃO DE 2-FENOXIETANOL E MENTOL
EM JUVENIS DE TILÁPIAS, *Oreochromis
niloticus***

LAVRAS - MG

2010

RAQUEL DE ANDRADE MELLO

**AVALIAÇÃO DE 2-FENOXIETANOL E MENTOL EM JUVENIS DE
TILÁPIAS, *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Priscila Vieira e Rosa

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Mello, Raquel de Andrade.

Avaliação de 2-fenoxietanol e mentol em juvenis de Tilápias,
(*Oreochromis niloticus*) / Raquel de Andrade Mello. – Lavras :
UFLA, 2010.

42 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Priscila Vieira e Rosa.

Bibliografia.

1. Peixes. 2. Anestésico. 3. Concentração. 4. Estágio anestésico.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3758

RAQUEL DE ANDRADE MELLO

**AVALIAÇÃO DE 2-FENOXIETANOL E MENTOL EM JUVENIS DE
TILÁPIAS, *OREOCHROMIS NILOTICUS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de julho de 2010.

Dra Paula Adriane Perez Ribeiro UFMG

Dr. Daniel Okamura UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dra Priscila Vieira e Rosa
Orientadora

LAVRAS - MG

2010

Às minhas avós por serem fonte de inspiração de luta.
A meus pais Hamilton e Adenir, por todo incentivo e apoio.
Por estarem sempre dispostos a escutar, aconselhar e ajudar.
Obrigada pela torcida e confiança e por me mostrarem a cada dia que a força
está dentro de mim.

Às minhas irmãs e cunhados pelo companheirismo e carinho. Obrigada por
estarem sempre presentes na minha vida, apoiando nos momentos difíceis.

Aos meus sobrinhos Raíssa, Gabriel, Matheus, Yasmin e ao meu irmão Kevin,
por alegrarem a minha vida.

Ao meu esposo Fábio, por estar sempre ao meu
lado, apoiando e incentivando.

À Maria Clara que nem nasceu, mas já é a luz da minha vida!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por a cada dia renovar a minha fé e me dar sabedoria para realizar o meu trabalho e nunca desistir

À Universidade Federal de Lavras por ter me concedido a oportunidade da realização do mestrado no programa de pós graduação em Ciências Veterinárias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Priscila Vieira e Rosa pela confiança e orientação.

Ao professor Dr. Luís David Solis Murgas pelo acolhimento e amizade.

A todos os professores da UFLA, pelos ensinamentos.

À Dra. Paula Adriane Perez Ribeiro e ao Dr. Daniel Okamura pelas sugestões durante o desenvolvimento do projeto.

Aos integrantes da banca de qualificação Márcio Zangerônimo e Luciano José Pereira pelas sugestões.

Aos colegas zootecnistas Tamira, Diego, Mirella, Renan e em especial a Leandro.

Aos funcionários da piscicultura pelos momentos de descontração.

Aos amigos Marinez Moraes, Viviane de Oliveira Felizardo e ao casal Ivan Bezerra Allaman e Izabel Fernanda Calleare que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar o tempo de indução e recuperação em tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*), submetidas ao 2-fenoxietanol ou ao mentol. Para isso, foram avaliadas cinco concentrações anestésicas quanto aos tempos de indução e de recuperação do 2-fenoxietanol (0,45 ml/L; 0,60 ml/L; 0,75 ml/L; 0,90 ml/L; 1,05 ml/L) e mentol (50 mg/L; 75 mg/L; 100 mg/L; 125 mg/L; 150 mg/L), em juvenis machos revertidos de tilápia. Os experimentos foram desenvolvidos independentemente em delineamento inteiramente casualizado (DIC), compostos de cinco tratamentos (concentrações de anestésico por litro de água) e 20 repetições (peixes) por tratamento. Foi utilizado um modelo linear generalizado com distribuição gama. A indução e a recuperação da anestesia foram divididas em três estágios, de acordo com o comportamento dos peixes sob efeito do anestésico, registrando-se o tempo de permanência em cada estágio. Antes de dar início aos testes as concentrações anestésicas foram diluídas em álcool e posteriormente adicionadas em aquários. Os parâmetros liminológicos da água foram controlados. A partir deste estudo, podemos concluir que, para juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*), sob as mesmas condições, com o aumento da concentração de 2-fenoxietanol e mentol ocorre uma redução do tempo de indução e recuperação anestésica. As concentrações de 0,45 ml/L de 2-fenoxietanol e 50 mg/L de mentol não foram adequadas para indução anestésica em tilápias.

Palavras-chave: Anestésico. Concentração. Estágio anestésico. Peixe.

ABSTRACT

This study aimed to determine the time of induction and recovery in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to 2-phenoxyethanol or menthol. For this, five concentrations were evaluated regarding the time of anesthetic induction and recovery of 2-phenoxyethanol (0, 45 ml / L, 0,60 ml / L, 0,75 ml / L, 0,90 ml / L, 1,05 ml/L) and menthol (50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 125 mg/L, 150 mg/L) reversed males in juvenile tilapia. The experiments were conducted independently in a randomized design (CRD), consisting of five treatments (concentrations of anesthetic per liter of water) and 20 repetitions (fish) per treatment. We used a generalized linear model with gamma distribution. The induction and recovery from anesthesia were divided into three stages, according to the fishes' behavior under the effect of the anesthetic, recording the time spent in each stage. Before beginning the tests anesthetic concentrations were diluted in alcohol and then added in aquariums. Limnologist parameters of water were controlled. From this study, we conclude that, for juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under the same conditions, with increasing concentration of 2-phenoxyethanol, menthol is a reduction in the time of anesthetic induction and recovery. Concentrations of 0,45 ml/L 2-phenoxyethanol and 50 mg/L menthol were not suitable or induction in tilapia.

Keywords: Anesthetic. Concentration. Stage anesthetic. Fish.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Anestésicos na piscicultura	12
2.1.1	2-Fenoxietanol	16
2.1.2	Mentol	18
2.2	Espécie estudada	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Local e duração do experimento	21
3.2	Animais e procedimentos de aclimação	21
3.3	Substâncias anestésicas utilizadas e procedimentos experimentais	22
3.4	Delineamento experimental	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura no Brasil vem crescendo rapidamente. No entanto, é bastante comum o relato de prejuízos econômicos em razão da mortalidade decorrente de deficiências gerais de manejo. Para facilitar o manejo e reduzir o estresse, a utilização de anestésicos torna-se necessária e, apesar disto, não existe legislação específica quanto ao uso de anestésicos no Brasil. Por este motivo, diversos anestésicos estão sendo testados em centros de pesquisas e universidades e entre eles estão a triclaína, benzocaína, óleo de cravo ou seu princípio ativo eugenol, quinaldina, mentol.

Cada anestésico vai exigir uma concentração diferente de acordo com o estágio de sedação desejado que vai desde uma sedação leve até uma sedação profunda. A escolha de um anestésico está relacionada com o preço, disponibilidade no mercado, eficiência, finalidade de uso e o destino do animal após a aplicação da droga.

Apesar da baixa disponibilidade no mercado e alto custo, do 2-fenoxietanol, diversos estudos comprovam que sua utilização é considerada apropriada para a prática da aquicultura por ser seguro, de fácil preparação, de ação e recuperação rápida. Possui margem de segurança adequada, pois doses até duas vezes maiores que a ideal não causam mortalidade.

O mentol é uma alternativa ao anestésico sintético, pois além de ser de fácil utilização, é facilmente encontrado em farmácias de manipulação a baixo custo e com boa margem de segurança. Entretanto, a concentração, tempo de indução e recuperação anestésica, ainda não foram determinadas para a maioria das espécies comerciais, incluindo a tilápia.

Juvenis de tilápias são afetados por uma série de agentes ou fatores estressantes, como captura, superpopulação, mudanças bruscas de temperatura, manuseio, barulho excessivo. Como conseqüências, podem ocorrer desde perda

do apetite e peso, redução no crescimento, aparecimento de doenças ou a morte dos animais. Apesar disto, faltam informações referentes ao comportamento desta espécie quando exposta a diferentes anestésicos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo determinar o tempo de indução e recuperação em tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*), submetidas ao 2-fenoxietanol ou ao mentol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anestésicos na piscicultura

O primeiro relato do uso de anestésicos em peixes foi em 1930. Desde então, diversos agentes químicos têm sido desenvolvidos e testados em peixes (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004), para facilitar o manejo e reduzir o estresse (ROSS; ROSS, 2008), sendo que os mais utilizados na aquicultura são: triclaína (MS 222), benzocaína, quinaldina, metomidato, 2-fenoxietanol, óleo de cravo ou seu ingrediente ativo eugenol e mentol (HOSKONEN; PIRHONEN, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; ROUBACH; GOMES, 2001).

Como no Brasil não existem leis específicas que regulamentem o uso de anestésicos em espécies de peixes comerciais, procura-se seguir as recomendações de países com regulamentos já definidos, como Reino Unido, Estados Unidos da América, União Europeia, Noruega, Filipinas e Nova Zelândia (FAÇANHA; GOMES, 2005; ROSS; ROSS, 2008).

Segundo Ross e Ross (2008), os anestésicos são administrados via imersão dos peixes em solução anestésica. A solução anestésica é captada pelas brânquias, principal rota de absorção e eliminação de anestésicos, difunde-se para o sangue, que o conduz até o sistema nervoso central (SNC) (Figura 1).

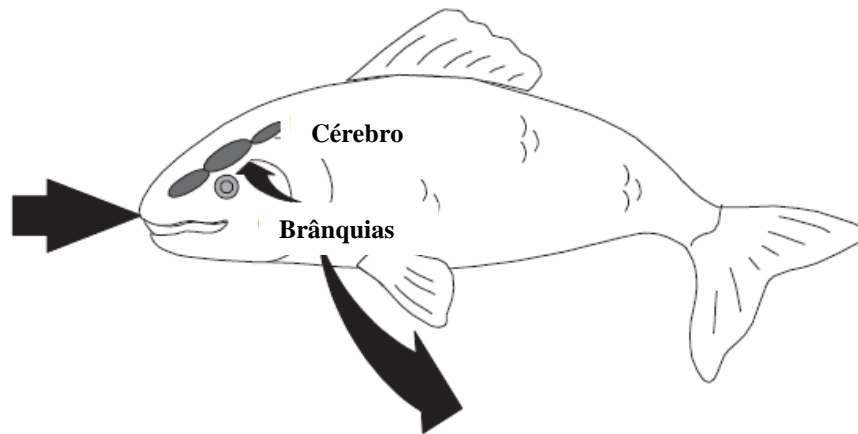


Figura 1 Rota das drogas ao sistema nervoso central dos peixes
Fonte: Adaptada de Ross e Ross (2008)

Ao chegar ao SNC os anestésicos causam depressão do mesmo, pela ação em axônios neuronais (figura 2). No entanto, pouco se sabe sobre o modo de ação preciso dos anestésicos em peixes. Porém, acredita-se que seja similar à anestesia inalatória utilizada em animais terrestres (UETA et al., 2007). Em geral, esta ação é acompanhada pela estabilização das membranas neuronais, incluindo depressão das estruturas pré-sinápticas, com conseqüente redução da quantidade de neurotransmissor liberado pelo impulso nervoso, assim como depressão dos receptores pós-sinápticos (ROSS; ROSS, 2008).

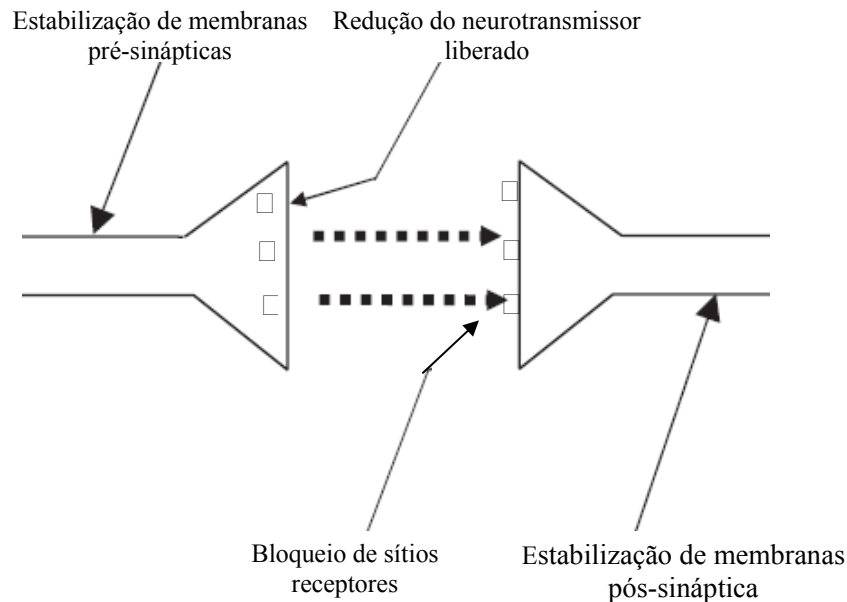


Figura 2 Mecanismo provável de ação dos agentes anestésicos
 Fonte: Adaptada de Ross e Ross (2008)

Estudos com eugenol indicam sua interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-aminobutírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), ambos com grande importância na transmissão da dor (AOSHIMA; HAMAMOTO, 1999; YANG et al., 2003). Musshoff et al. (1999) puderam verificar que o 2-fenoxietanol inibe a atividade dos receptores de glutamato do tipo NMDA reduzindo a dor. Em peixes a benzocaína age bloqueando canais de sódio, reduzindo os potenciais de ação (ARIAS, 1999).

Os anestésicos podem bloquear os receptores da adrenalina (inibindo o seu efeito), impedindo a ação dos transmissores sensoriais do hipotálamo ou atuando diretamente nas células inter-renais (bloqueando os receptores do hormônio adrenocorticofoico, ACTH), reduzindo a liberação de corticoides

(GERWICK; DEMERS; BAYNE, 1999; OLSEN; EINARSDOTTIR; NILSSEN, 1995; SANDODDEN; FINSTAD; IVERSEN, 2001).

Diversos estágios de indução e recuperação foram descritos na literatura e estes se diferenciam um do outro de acordo com características comportamentais que os animais apresentam (WOOD; NELSON; RAMSTAD, 2002). A determinação do tempo adequado para que o animal chegue a um determinado estágio anestésico é de fundamental importância no planejamento do manejo que será utilizado na piscicultura (ROUBACH; GOMES, 2001). A duração de cada estágio anestésico varia de acordo com a droga, método utilizado, espécie e condições biológicas e ambientais (ROSS; ROSS, 2008).

Os critérios utilizados para escolha dos anestésicos levam em consideração: custo, disponibilidade no mercado, facilidade de uso com baixos riscos para os animais e o homem, toxicidade, curto tempo de indução (em torno de três minutos), e recuperação (por volta de cinco minutos), não deixar efeitos persistentes no comportamento dos peixes quando anestesiados sucessivamente (KING et al., 2005; ROSS; ROSS, 2008).

Uma variedade de estudos tem sido realizados para verificar a influência de fatores, como espécie, comprimento, conteúdo de lipídios, peso do peixe, além da temperatura, dose, pH da água, e estresse no processo de anestesia em peixes (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004; KING et al., 2005; MYLONAS et al., 2005; OKAMURA et al., 2010; VELÍŠEK et al., 2009; WALSH; PEASE, 2002; ZAHL et al., 2009). Porém, o mecanismo pelo qual muitos desses fatores influenciam na anestesia ainda não foi esclarecido.

Diversas alterações metabólicas são decorrentes do efeito da anestesia, que vão desde uma leve sedação, até o colapso medular, levando à morte (HOLLOWAY et al., 2004).

Os anestésicos usados em peixes geralmente afetam músculos e nervos interferindo nos movimentos musculares e nas transmissões de informações

sensoriais (HILL; DAVISON; FOSTER, 2002). A redução do movimento muscular durante a anestesia é devida ao efeito direto do anestésico nos nervos, na musculatura lisa e no músculo do coração (ROTHWELL et al., 2005).

O batimento cardíaco tem uma frequência controlada por diversos fatores metabólicos, que podem sofrer interferência da presença de agentes como os anestésicos, levando a um quadro de arritmia cardíaca. Estes agentes químicos bloqueiam nervos incapacitando a contração muscular, o que prejudica a circulação sanguínea (HILL; DAVISON; FOSTER, 2002; ROTHWELL et al., 2005).

Nas brânquias, os anestésicos cessam o movimento opercular conforme o químico atinge os nervos e o coração, reduzindo a circulação sanguínea e levando a uma parada respiratória (HILL; DAVISON; FOSTER, 2002), o que desacelera o metabolismo e reduz a exigência de oxigênio pelo peixe (COOKE et al., 2004).

2.1.1 2-fenoxietanol

Entre os muitos agentes anestésicos utilizados, o 2-fenoxietanol (Etileno glicol éter monofenil, $C_8H_{10}O_2$) é um óleo aromático com coloração variando do incolor ao amarelo-palha (Figura 3). Sua utilização é considerada apropriada para a prática da aquicultura por ser seguro, de fácil preparação, de ação e recuperação rápida. Além de ser utilizado como anestésico tópico, também atua como bactericida e fungicida em cirurgias (ROSS; ROSS, 2008; ROUBACH; GOMES, 2001).

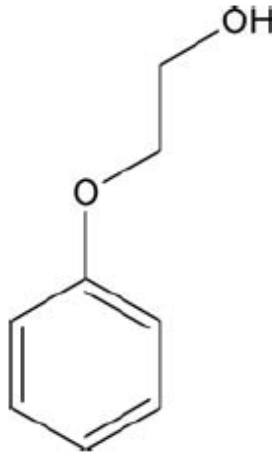


Figura 3 Estrutura química do 2-fenoxietanol
Fonte: Adaptada de Ross e Ross (2008)

Estudos com tenca (*Tinca tinca* L.) mostraram que o uso de 2-fenoxietanol, como substância anestésica, proporcionou indução e recuperação rápidas à analgesia (HAMACKOVA et al., 2004). Mylonas et al. (2005), ao anestesiarem robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Sparus aurata*) em diferentes dosagens anestésicas, verificaram que o aumento da concentração promoveu uma indução mais rápida. No entanto, o mesmo comportamento não ocorre na recuperação. Tsantilas et al. (2006) ao anestesiarem duas espécies de sargo (*Diplodus sargus* L. e *Diplodus puntazzo* C.) verificaram que dosagens de 0,3 mL e 0,4 mL de 2-fenoxietanol causaram demora na recuperação. Weber et al. (2009) relataram que o 2-fenoxietanol se mostrou seguro como anestésicos para linguado (*Solea senegalensis*), após um período de 60 minutos de exposição dos animais à solução anestésica.

2.1.2 Mentol

Entre os anestésicos naturais produzidos no Brasil, encontra-se o mentol $C_{10}H_{20}$ (figura 4), que é facilmente encontrado em farmácias de manipulação a custo reduzido (FAÇANHA; GOMES, 2005; ROUBACH; GOMES, 2001).

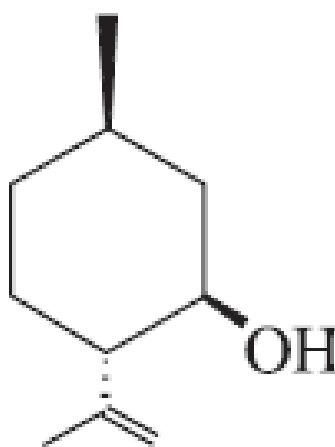


Figura 4 Estrutura química do mentol
Fonte: Ross e Ross (2008)

Existe pouca informação sobre a farmacocinética deste anestésico em peixes. Alguns estudos reportam com sucesso a sua utilização em algumas espécies nativas. Em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), foi relatado que os animais passam sequencialmente por todos os estágios anestésicos e que apresenta boa margem de segurança (FAÇANHA; GOMES, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Gonçalves et al. (2008), com juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em que estes autores verificaram que nas concentrações testadas os animais passam por todos os estágios anestésicos e que para esta espécie também apresenta boa margem de segurança.

2.2 Espécie estudada

A tilápia, *Oreochromis niloticus*, é um peixe diurno, onívoro (BARROS et al., 2002; LOURES et al., 2001), pertencente à família ciclidae, cuja maioria é originária de rios africanos (HILSDORF, 1995). Segundo os dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2009), apresentados na Figura 5, a tilápia ocupa a terceira posição dentre as espécies de peixes mais cultivadas no mundo.

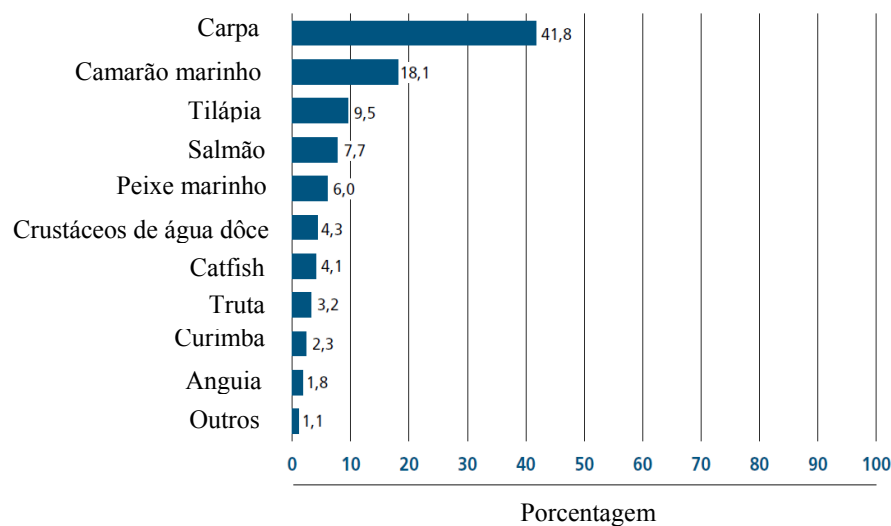


Figura 5 Estimativa da produção mundial de alimentos pela aquicultura, em 2005, das principais espécies cultivadas
Fonte: Adaptada da FAO (2009)

As razões para sua grande utilização são devidas às características desejáveis como alta adaptação em condições ambientais adversas, como baixo nível de oxigênio, altos níveis de amônia dissolvidos na água, rápido crescimento e boa conversão alimentar (WU; ROSATI; SESSA, 1995). Além disto, a tilápia tem boa aceitação no mercado consumidor por possuir carne

saborosa, de cor branca e com baixo teor de gordura e com ausência de espinhos intramusculares (BOSCOLO et al., 2001; FURUYA et al., 2004).

A captura, o transporte, superpopulação, manuseio e barulho excessivo são fatores que podem prejudicar a criação de juvenis de peixes (OLIVEIRA; CARMO; OLIVEIRA, 2009). Apesar da tilápia ser o principal peixe criado no mundo, a literatura referente ao uso de anestésicos para esta espécie é bastante limitada. Até o momento, as principais referências são para a benzocaína (OKAMURA et al., 2010), eugenol (VIDAL et al., 2008) e óleo-de cravo (OLIVEIRA; CARMO; OLIVEIRA, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e duração do experimento

O experimento foi conduzido no laboratório de Nutrição de Peixes da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre os meses de abril e maio de 2010.

3.2 Animais e procedimento de aclimação

Juvenis machos revertidos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), foram adquiridos da piscicultura Aquasul, situada no município de Areado, MG, e transportados para o laboratório de Nutrição de Peixes da UFLA. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 caixas de metabolismo, de polipropileno, com capacidade para 250 L, onde foram aclimatados por 15 dias. A água utilizada no sistema foi proveniente de um tanque de decantação, inserida nas caixas de metabolismo, após filtragem em filtro de areia (com capacidade de reter partículas com 5 µm) e esterilizada com radiação ultravioleta.

Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 32% de proteína bruta, *ad libitum*, fornecida duas vezes ao dia, períodos nos quais foram também monitorados os parâmetros limnológicos padrão nas caixas de metabolismo.

A temperatura da água, teor de oxigênio foram medidos semanalmente por um oxímetro digital portátil. A temperatura média da água foi mantida por meio de termostato a 28°C e a oxigenação de 6,5 dL/L. O pH da água foi medido semanalmente e se encontrava dentro da faixa da neutralidade. As caixas foram sifonadas diariamente para a retirada de restos de ração e excretas.

3.3 Substâncias anestésicas utilizadas e procedimentos experimentais

Foram realizados dois experimentos independentes. As concentrações de 2-fenoxietanol e mentol foram testadas a partir dos resultados observados em outros trabalhos e estabelecidas por meio de um teste piloto (SIMÕES; GOMES, 2009; ZAHL et al., 2009).

Os procedimentos de anestesia foram realizados no período diurno em aquários de vidro com capacidade para 20 L (Figura 6), preenchidos com 15 L de água. Para se determinar a influência da concentração, na indução e recuperação anestésica dos animais, foram testados dois anestésicos e cinco concentrações (tabela 1).



Figura 6 Local onde foram realizados os procedimentos de anestesia

Tabela 1 Concentrações dos anestésicos avaliados para tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

ANESTÉSICOS	CONCENTRAÇÕES				
	1	2	3	4	5
2-fenoxietanol (ml/L)	0,45	0,6	0,75	0,9	1,05
Mentol (mg/L)	50	75	100	125	150

Durante o teste piloto, foi feito um ensaio com diluições em álcool (92,8°GL) com ambos os anestésicos. A diluição em 15 mL de álcool para 2-fenoxietanol e 22 mL de álcool para mentol se mostrou adequada para todas as concentrações testadas.

Para cada dosagem anestésica testada, foram utilizados 20 juvenis (n = 20), coletados aleatoriamente e submetidos, individualmente, ao banho anestésico, totalizando 100 peixes/anestésico. Quando atingiram o estágio anestésico 3 (anestesia profunda) (Tabela 2), os peixes foram retirados do aquário de indução, pesados e transferidos para outro aquário de vidro, com as mesmas proporções, preenchido com 15 L de água isenta de anestésico, para avaliação da recuperação da anestesia. O tempo gasto até o animal atingir os estágios de anestesia e de recuperação foi cronometrado e registrado.

Tabela 2 Peso médio dos peixes durante cada tratamento anestésico

ANESTÉSICOS	PESO ± DESVIO PADRÃO
2-Fenoxietanol (ml/L)	82,4 ± 20,7
Mentol (mg/L)	63,3 ± 21,6

Para os ensaios experimentais, os peixes foram considerados anestesiados e recuperados ao atingirem um conjunto de sinais peculiares, característicos do estágio três da anestesia, de acordo com Okamura et al. (2010), conforme ilustrado na Tabela 3. Esses sinais peculiares foram

registrados através da análise visual e monitorados por câmeras acopladas aos aquários.

Tabela 3 Características comportamentais em peixes, em três estágios de anestesia e recuperação

Estágios anestésicos	Indução	Recuperação
1	Movimento natatório reduzido, reação a estímulos externos e equilíbrio normal.	Leve recuperação do movimento opercular e dos movimentos natatório.
2	Perda do movimento muscular e do equilíbrio, redução do movimento opercular e dos reflexos a estímulos externos.	Recuperação do equilíbrio e leve reação a estímulos externos.
3	Perda total dos reflexos a estímulos externos e movimento opercular quase ausente.	Recuperação total

Fonte: Okamura et al. (2010)

Os aquários foram lavados após cinco peixes serem anestesiados individualmente no sentido de evitar o acúmulo de resíduo anestésico, totalizando 20 peixes por tratamento.

3.4 Delineamento experimental

Os experimentos foram desenvolvidos independentemente em delineamento inteiramente casualizado (DIC), compostos de cinco tratamentos (concentrações de anestésico por litro de água) e 20 repetições (peixes) por tratamento. Foi utilizado um modelo linear generalizado com distribuição gama, representado por $\log(E[y_{ij}]) = \mu + t_i + t_i^2 + e_{ij}$, sendo:

y_{ij} = observação referente à concentração i na repetição j

μ = constante representada pela média geral;

t_i = efeito da concentração de anestésico i ($i = 1, \dots, 5$);

t_i^2 = efeito quadrático da concentração de anestésico i ($i = 1, \dots, 5$);

e_{ij} = desvio associado a cada observação que, por hipótese, tem distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

O software utilizado para as análises foi o R.2.11.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tilápias, expostas ao 2-fenoxietanol e ao mentol passaram seqüencialmente por todos os estágios de anestesia em todas as concentrações testadas. Nos gráficos 1 e 2 se encontram os tempos estimados de indução, já nas figuras 9 e 10 encontram-se os tempos de recuperação de ambos os anestésicos, em todas as concentrações testadas. O mesmo comportamento foi observado com catfish (*Silurus glanis* L.) quando anestesiados com 2-fenoxietanol nas concentrações de 0,3 - 1,1ml/L (VELÍŠEK et al., 2007) e com tabaquis quando anestesiados com mentol (50-250 mg/L) (FAÇANHA; GOMES, 2005).

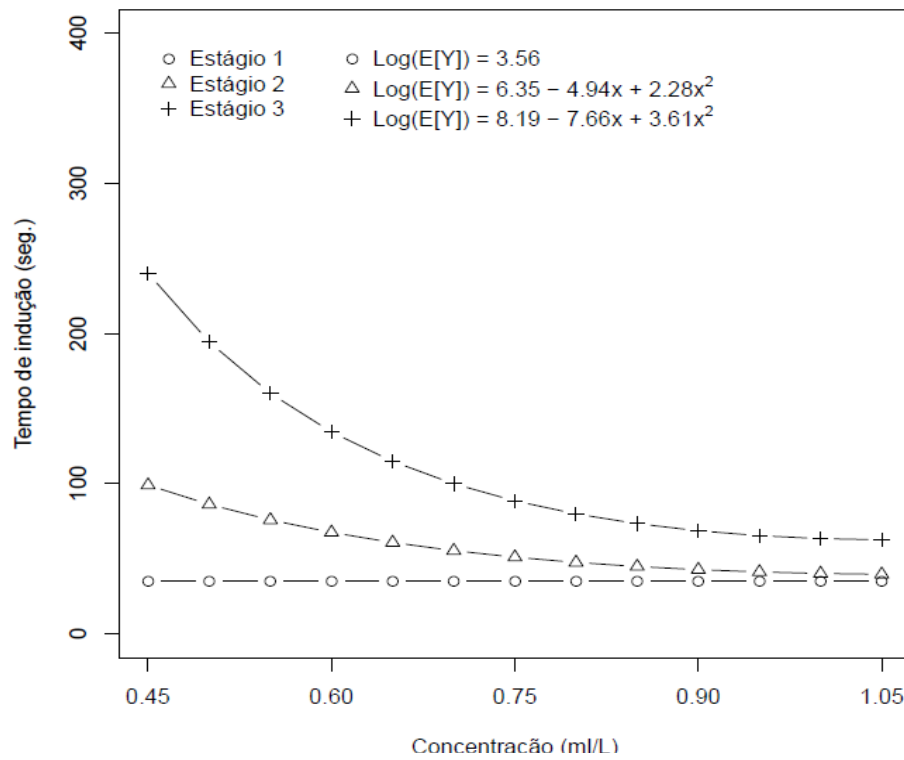


Gráfico 1 Tempos de permanência de tilápias-do-nilo em cada estágio de indução anestésica, após imersão em diferentes concentrações de 2-fenoxietanol

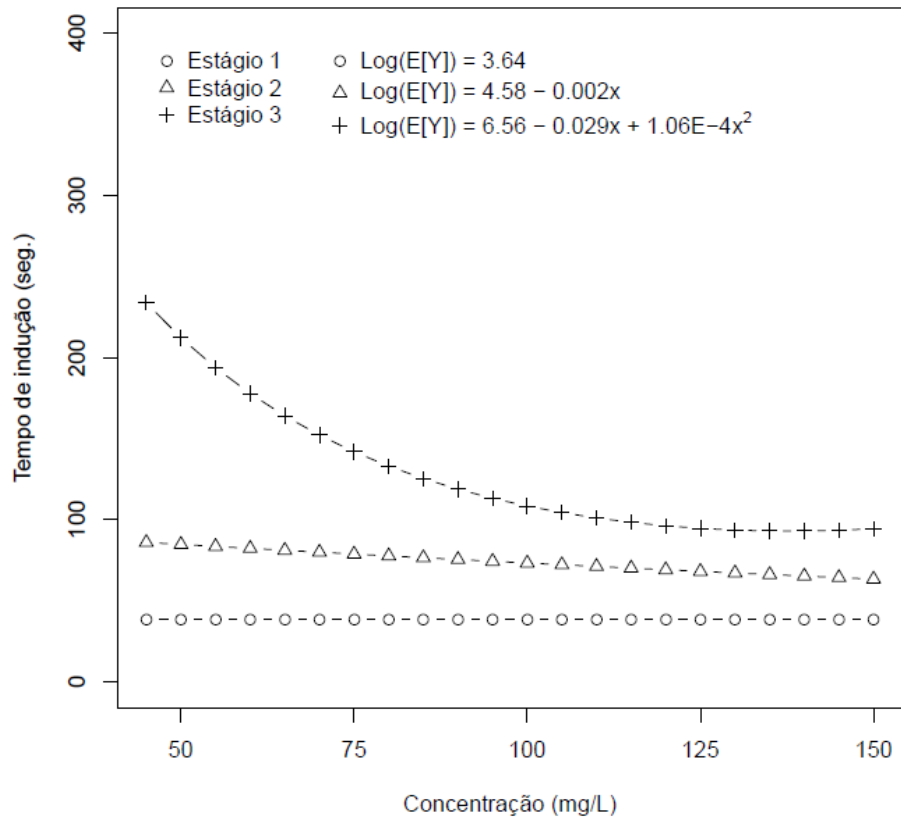


Gráfico 2 Tempos de permanência de tilápias-do-nilo em cada estágio de indução anestésica em diferentes concentrações de mentol

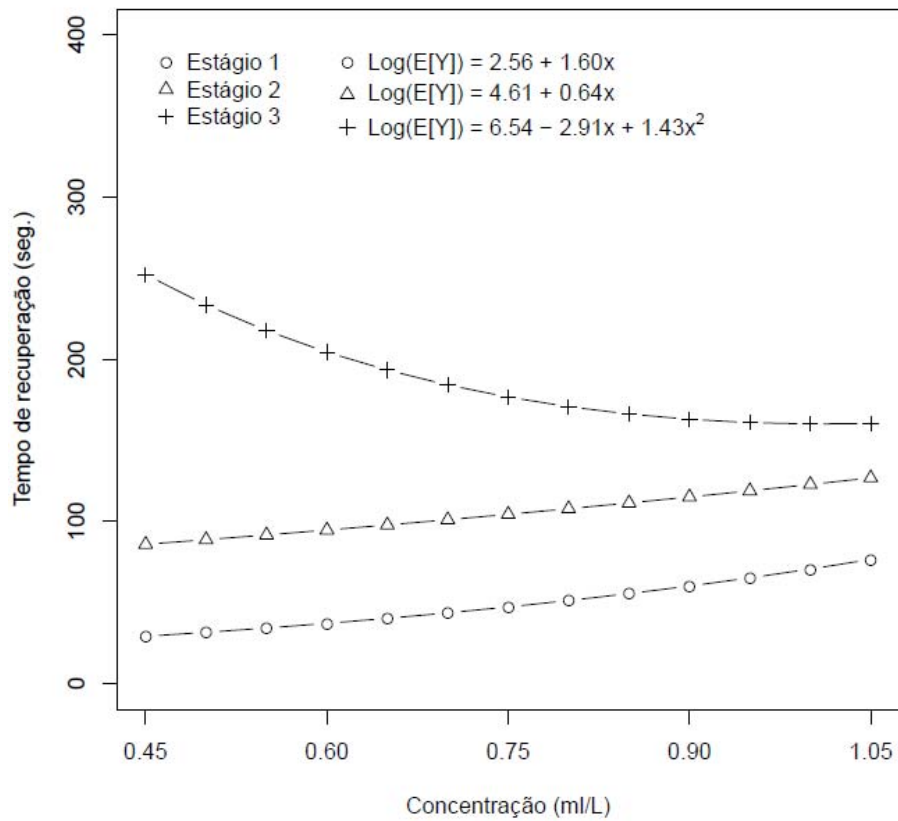


Gráfico 3 Tempos de permanência de tilápias-do-nylo em cada estágio de recuperação anestésica após imersão em diferentes concentrações de 2-fenoxietenol

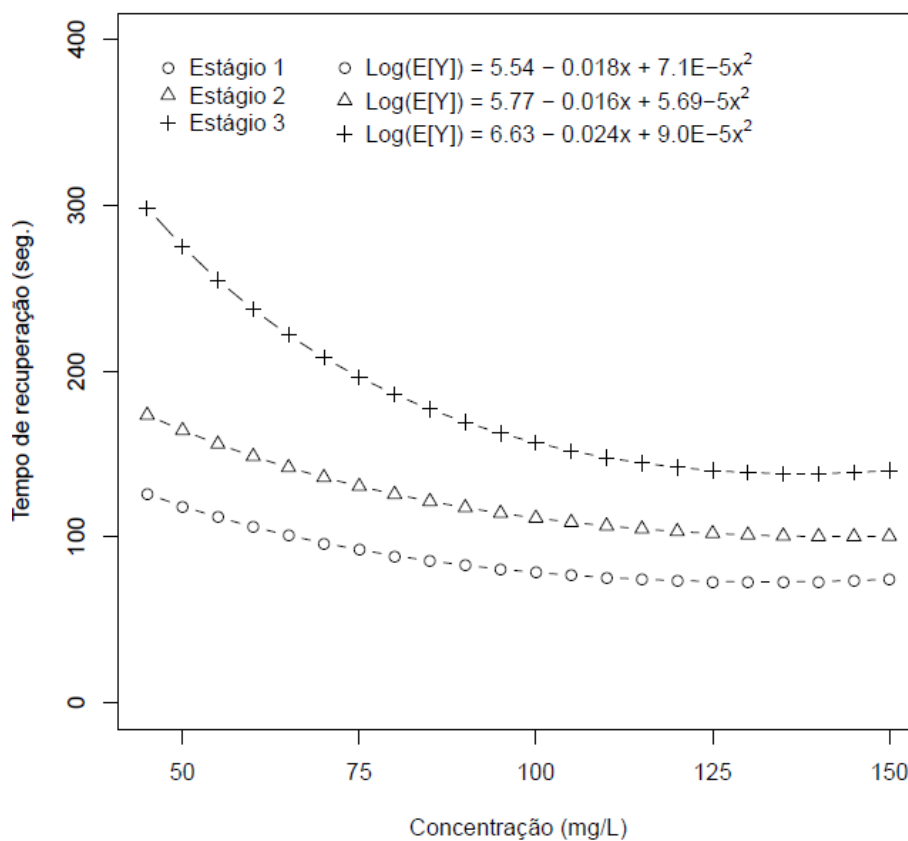


Gráfico 4 Tempos de permanência de tilápias-do-nilo em cada estágio de recuperação anestésica em diferentes concentrações de mentol

As variações nas concentrações de 2-fenoxietanol e mentol promoveram alterações no comportamento dos animais durante o processo de anestesia e de recuperação. (Tabela 3)

Na maioria das pesquisas com anestésicos são utilizados diferentes estágios de indução à anestesia como parâmetro de eficiência. Entretanto, apesar de sua grande importância prática, os estágios de recuperação dificilmente são explorados.

Em todas as cinco concentrações testadas de 2-fenoxietanol e mentol não houve efeito da concentração no tempo de indução para chegada ao estágio 1.

Os animais tratados com 0,45ml/L de 2-fenoxietanol e 50 mg/L de mentol permaneceram no segundo estágio de indução por tempo maior que as demais concentrações e também demoraram mais para atingir o estágio 3 de anestesia.

Foi relatado por King et al. (2005) ao anestésiar corvinas com óleo de cravo que a liberação dos corticosteroides concentra-se no estágio 2 de anestesia. Portanto, quanto mais breve a passagem por esta etapa, menor seria a liberação dessas substâncias pelo organismo. No entanto, o mecanismo como isto acontece, ainda não foi esclarecido e mais estudos deveriam ser realizados para os outros agentes anestésicos.

Façaanha e Gomes (2005) ao estudarem juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), concluíram que quando utilizavam a concentração de 100 mg/L, o tempo que os animais demoravam para atingir o último estágio era de aproximadamente $4,4 \pm 0,42$ minutos. No entanto, tempos menores (102 ± 29 segundos) para chegar ao último estágio anestésico, utilizando esta mesma dosagem para o mesmo manejo foi encontrado em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (GONÇALVES et al., 2008). Este resultado é semelhante ao encontrado no presente estudo, pois o tempo que juvenis de tilápia levaram para atingir o último estágio de anestesia foi de 108,5 segundos para a mesma dosagem. O intervalo de tempo entre a exposição ao fenoxietanol e mentol para a manifestação dos sinais característicos do estágio 3 de anestesia, encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 Tempo estimado em segundos, de indução e recuperação de tilápias, expostas individualmente a diferentes concentrações de 2-fenoxietanol e mentol, sendo E1= estágio 1, E2= estágio 2, E3= estágio 3

Anestésicos	Concentrações	Indução			Recuperação		
		E1	E2	E3	E1	E2	E3
2-fenoxietanol (ml/L)	0,45	35,3	99,1	240,2	29,3	85,9	252,2
	0,6	35,3	67,6	134,4	37,2	94,7	204,4
	0,75	35,3	51,1	88,6	47,3	104,4	176,7
	0,9	35,3	42,8	68,6	60,2	115,1	163,0
	1,05	35,3	39,7	62,6	76,6	126,9	160,4
Mentol (mg/L)	50	38,3	84,8	212,3	118,6	164,3	275,3
	75	38,3	78,9	142,0	92,4	130,6	196,4
	100	38,3	73,4	108,5	78,7	111,5	156,8
	125	38,3	68,2	94,7	73,2	102,2	140,1
	150	38,3	63,4	94,5	74,6	100,5	140,2

De modo geral, com o aumento da concentração, a transição entre os estágios de anestesia foi mais rápida no período de indução (Gráfico 1 e 2) e recuperação (Gráfico 3 e 4). Porém, a partir da dosagem de 0,9 ml/L para 2-fenoxietanol e 125 mg/L para mentol a diferença de tempo para a maior dosagem passa a não ser significativa para fins de manejo. (Tabela 5)

Tabela 5 Diferença do tempo estimado de indução e recuperação no estágio 3 de anestesia para tilápias expostas a 2-fenoxietanol e mentol, a partir da maior concentração do anestésico

Anestésico	Concentração	Diferença de tempo (segundos)*	
		Indução	Recuperação
2-fenoxietanol (ml/L)	0,45	177,6	91,8
	0,6	71,8	44
	0,75	26	16,3
	0,9	6	2,6
	1,05	0	0
Mentol (mg/L)	50	117,8	135,1
	75	47,5	56,2
	100	14	16,6
	125	0,2	-0,1
	150	0	0

*diferença de tempo = tempo na maior concentração – tempo nas concentrações menores

Resultados semelhantes foram encontrados por Mylonas et al. (2005), acompanhando a ação do 2-fenoxietanol (200 mg/L; 300 mg/L; 400 mg/L) em juvenis de perca (*Dicentrarchus labrax*) e robalo (*Sparus aurata*). Estes autores verificaram que com o incremento da concentração, reduzia o tempo de indução e depois ocorria uma estabilização. O mesmo foi verificado por Basaran, Sen e Karabulut (2007) e Weber et al. (2009), ao anestesiarem com este anestésico, respectivamente, juvenis de perca (*Dicentrarchus labrax*) em dosagens variando de 0,15 ml/L -0,45 ml/L e linguado (*Solea senegalensis*) em dosagens variando entre 50-100 mg/L. Supõe-se que esta rápida indução ocorre em razão da alta

solubilidade do anestésico em lipídios corporais (HUNN; ALLEN, 1974). Velíšek et al. (2007) ao utilizarem concentrações crescentes (0,3 ml/L a 1,1 ml/L) de 2-fenoxietanol em catfish (*Silurus glanis* L.) a 20°C perceberam este mesmo padrão de anestesia. Estes autores perceberam que, ao aumentar a concentração anestésica, reduzia o tempo que o animal levava para atingir o estágio 3. Estes resultados diferem quanto ao estágio 1 de anestesia do presente estudo, pois o aumento da concentração com este anestésico não levou a uma redução no tempo de manifestação dos primeiros sintomas.

A indução ao último estágio de anestesia foi mais rápida em concentrações superiores a 150 mg /L de mentol com tilápias (*Oreochromis niloticus*) (SIMÕES; GOMES, 2009) e com tambaqui (*Colossoma macropomum*) (FAÇANHA; GOMES, 2005) Estes resultados diferem dos encontrados no presente estudo com mentol em que o tempo de indução ao estágio 3 foi mais rápido em concentrações acima de 125 mg/L (tabela 4).

Ao utilizar a primeira concentração de ambos os anestésicos citados, a perda total do equilíbrio na coluna de água ocorria em torno de 240,2 segundos para 2-fenoxietanol e 212,3 segundos para mentol, indicando que o tempo de indução não foi considerado compatível com o limite ideal para um anestésico sugerido por Keene et al. (1998), de 180 segundos.

Todas as dosagens de 2-fenoxietanol e mentol estudadas proporcionaram tempo de recuperação compatível com o limite ideal para um anestésico sugerido por Keene et al. (1998), de 300 segundos (Tabela 4).

No entanto, os grupos sedados com 0,45 ml/L de 2-fenoxietanol e 50 mg/L de mentol foram os que mais se aproximaram desse limite, apresentando tempos de recuperação de 252,2 e 275,3 segundos, respectivamente. Esses resultados se assemelham aos de Velíšek et al. (2007), em que estes autores, observaram recuperação total em aproximadamente 300 segundos ao utilizarem a concentração de 0,3ml/L de 2-fenoxietanol em catfish (*Silurus glanis* L.).

Façanha e Gomes (2005) ao utilizarem a mesma dosagem de mentol em tambaqui também encontraram recuperação por volta de 300 segundos.

Façanha e Gomes (2005) ao utilizarem a dosagem de 150 mg/L de mentol para juvenis de tambaqui os animais levaram 30 segundos para chegar ao último estágio de anestesia. Esta mesma dosagem foi testada no presente trabalho, porém os animais necessitaram de um tempo maior para chegarem ao estágio 3 de anestesia (140,2 segundos).

Em todos os anestésicos testados, ocorreu uma redução no tempo de indução e recuperação (Tabela 5).

Com o incremento na concentração de 2-fenoxietanol ocorre um aumento no tempo para que os animais atinjam o estágio 1 e 2 de recuperação anestésica. No entanto, o animal atinge o estágio 3 em menor tempo e a passagem do estágio 2 para o 3 também é reduzida. Já a utilização de doses crescentes de mentol proporcionou uma diminuição no tempo para que os animais atingissem os estágios 1, 2 e 3 de recuperação anestésica.

Velíšek et al. (2007) ao utilizar 2-fenoxietanol com catfish europeu (*Silurus glanis L.*) encontraram resultados diferentes destes, pois com o aumento da concentração os animais demoram mais para se recuperarem, não ocorrendo estabilização da concentração sobre os tempos de recuperação. Façanha e Gomes (2005), ao anestesiarem juvenis de tambaqui com mentol, encontraram uma relação inversa à encontrada neste estudo, ou seja, com o aumento da concentração (100 mg/L para 150mg/L) os animais demoravam mais para se recuperarem. E só a partir da concentração de 150 mg/L a dose deixou de influenciar os tempos de recuperação.

5 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, podemos concluir que, para juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*), sob as mesmas condições, com o aumento da concentração de 2-fenoxietanol e mentol, ocorre uma redução do tempo de indução e recuperação anestésica.

As concentrações de 0,45 ml/L de 2-fenoxietanol e 50 mg/L de mentol não são adequadas para indução anestésica em tilápias.

REFERÊNCIAS

- AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 4, p. 743-748, 1999.
- ARIAS, H. R. Role of local anesthetics on both cholinergic and serotonergic ionotropic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 817-843, Oct. 1999.
- BARROS, M. M. et al. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 6, p. 2149-2156, nov./dez. 2002.
- BASARAN, F.; ŞEN, H.; KARABULUT, K. Effects of 2-phenoxyethanol on survival of normal juveniles and malformed juveniles having lordosis or nonfunctional swimbladders of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 38, n. 9, p. 933-939, June 2007.
- BOSCOLO, W. R. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.
- COOKE, S. J. et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, n. 1/4, p. 509-529, Sept. 2004.
- FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/sofia/em>>. Acesso em: 23 set. 2009.

FURUYA, W. M. et al. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante o período de reversão de sexo. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 299-303, 2004.

GERWICK, L.; DEMERS, N. E.; BAYNE, C. J. Modulation of stress hormones in rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 124, n. 3, p. 329-334, Nov. 1999.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

HAMACKOVA, J. et al. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca* L.) related to water temperature. **Veterinarni Medicina**, Praha, v. 49, n. 12, p. 467-472, 2004.

HILL, J. V.; DAVISON, W.; FORSTER, M. E. The effects of fish anaesthetics (TRICAÍNA, metomidate and AQUI-S) on heart ventricle, the cardiac vagus and branchial vessels from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 1/2, p. 19-28, Sept. 2002.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, 1995.

HOLLOWAY, A. C. et al. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1025-1030, July 2004.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 409-415, Mar. 2006.

_____. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 1136-1142, Apr. 2004.

HUNN, J. B.; ALLEN, J. L. Movement of drugs across the gills of fishes. **Annual Review Pharmacology**, Palo Alto, v. 14, p. 47-55, Apr. 1974.

KEENE, J. I. et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 89-101, Feb. 1998.

KING, W. V. et al. 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**, Oxford, v. 36, n. 14, p. 1442-1449, Oct. 2005.

LOURES, B. T. R. R. et al. Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 877-883, 2001.

MUSSHOFF, U. et al. Effects of 2-phenoxyethanol on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated ion currents. **Archives of Toxicology**, New York, v. 73, n. 1, p. 55-59, Mar. 1999.

MYLONAS, C. C. et al. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1/4, p. 467-481, May 2005.

OKAMURA, D. et al. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 5, p. 971-976, maio 2010.

OLIVEIRA, J. R.; CARMO, J. L.; OLIVEIRA, K. K. C. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 7, p. 1163-1169, dez. 2009.

OLIVEIRA, J. R. et al. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 7, p. 1163-1169, dez. 2009.

OLSEN, Y. A.; EINARSDOTTIR, I. E.; NILSSEN, K. J. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 155-168, July 1995.

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

ROTHWELL, S. E. et al. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 140, n. 3, p. 289-298, Mar. 2005.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.

SANDODDEN, R.; FINSTAD, B.; IVERSEN, M. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*): anaesthesia and recovery. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 87-90, Feb. 2001.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 613-620, maio/jun. 2009.

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.* **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, n. 1/4, p. 64-70, Mar. 2006.

UETA, K. et al. Local anesthetics have different mechanisms and sites of action at recombinant 5-HT₃ receptors. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Secaucus, v. 32, n. 6, p. 462-470, Nov. 2007.

VELÍŠEK, J. et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 354-361, Feb. 2009.

_____. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis L.*). **Veterinarni Medicina**, Praha, v. 52, n. 3, p. 103-110, 2007.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, ago. 2008.

WALSH, C. T.; PEASE, B. C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 627-635, July 2002.

WEBER, R. A. et al. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Linguado (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, n. 1/2, p. 147-150, Mar. 2009.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 2, p. 340-347, Feb. 2002.

WU, V. Y. et al. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in tilapia diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 6, p. 1585-1588, June 1995.

YANG, B. H. et al. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 82, n. 10, p. 781-785, Oct. 2003.

ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*): effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 295, n. 1/2, p. 52-59, Oct. 2009.

ANEXO-A

Quadro 1 - Efeito dos coeficientes dos modelos de regressão com distribuição gamma.

F.V	2-Fenoxietanol					
	Estágio de indução			Estágio de recuperação		
	1	2	3	1	2	3
Intercepto	0,0034*	0,0005*	0,0015*	1,3e-6*	3,5e-3*	0,0041*
Peso	0,1109	0,533	0,9984	0,6885	0,0685	0,0659
Dose	0,0892	4,4e-14*	8,5e-16*	9,3e-10*	3,4e-4*	2,0e-5*
Dose*Peso	0,2446	0,774	0,9728	0,8441	0,1085	0,1636
Dose ²	0,5264	0,0157*	0,0167*	0,528	0,1481	0,0134*
	Mentol					
	Estágio de indução			Estágio de recuperação		
	1	2	3	1	2	3
Intercepto	0,0001*	4,5e-4*	0,0001*	4,5e-4*	0,0001*	0,0001*
Peso	0,1633	0,5256	0,0865	0,7222	0,3708	0,4568
Dose	0,0605	0,0186*	8,6e-8*	0,0019*	4,6e-5*	1,5e-8*
Dose*Peso	0,3692	0,1096	0,0947	0,927	0,6616	0,1118
Dose ²	0,6572	0,2291	0,0424*	0,0213*	0,0012*	0,0012*

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.