



LEANDRO SANTOS COSTA

**AVALIAÇÃO DE ÓLEO DE CRAVO E
BENZOCAÍNA COMO ANESTÉSICOS PARA
JUVENIS DE TILÁPIA NILÓTICA**

LAVRAS-MG

2011

LEANDRO SANTOS COSTA

**AVALIAÇÃO DE ÓLEO DE CRAVO E BENZOCAÍNA COMO
ANESTÉSICOS PARA JUVENIS DE TILÁPIA NILÓTICA**

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

Orientadora

Dra. Priscila Vieira e Rosa

LAVRAS - MG

2011

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

Costa, Leandro Santos.

Avaliação de óleo de cravo e benzocaína como anestésicos para juvenis de tilápia nilótica / Leandro Santos Costa. – Lavras : UFLA, 2012.

53 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Priscila Vieira e Rosa.

Bibliografia.

1. *Oreochromis niloticus*. 2. Anestesia. 3. Tempo de indução. 4. Concentração. 5. Tempo de recuperação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3758

LEANDRO SANTOS COSTA

**AVALIAÇÃO DE ÓLEO DE CRAVO E BENZOCAÍNA COMO
ANESTÉSICOS PARA JUVENIS DE TILÁPIA NILÓTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 08 de dezembro de 2011

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas	DZO/UFLA
Dr. Daniel Okamura	DZO/UFLA
Prof ^ª . Dra. Paula Adriane Perez Ribeiro	DZO/UFMG - Belo Horizonte

Prof^ª. Dra. Priscila Vieira e Rosa
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS – MG
2011

Agradeço a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida e por mais esta realização que me foi concedida.

Aos meus pais, João Gualberto e Cleusa Fátima, pelo carinho, amor e compreensão.

Aos meus irmãos, Natália e Lucas, que sempre torceram por mim.

Aos demais familiares, por seu apoio e incentivo.

OBRIGADO!!!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), pelas oportunidades a mim concedidas e pelo apoio financeiro.

Ao MPA (Ministério da Aquicultura e Pesca), pelo apoio financeiro.

À professora Priscila Vieira e Rosa, pela orientação, grande amizade e valiosos ensinamentos.

À Professora Paula Adriane Perez Ribeiro, por estar sempre disposta a me ajudar nos diversos trabalhos desenvolvidos ao longo dos anos e por seu companheirismo.

Ao professor Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, por sua contribuição durante as análises estatísticas.

A Dr. Daniel Okamura, pela coorientação e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao grande companheiro de trabalho Renan Rosa Paulino, pela ajuda na condução de todo o experimento.

Aos amigos Felipe Guedes, Paulino, Aline, Marinez, Natália M., Lucas Guerra, Raquel Pereira, Martha e demais colegas de mestrado, que indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UFLA, Elici Pereira e José Roberto, pelo auxílio na construção, condução do experimento e sugestões.

A Neira Perez y Judith Ochoa, por la ayuda en la estación de piscicultura em mi período de defenza.

Aos demais professores e colegas do Departamento de Zootecnia e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!

RESUMO

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Nutrição de Peixes da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) com o objetivo de avaliar o efeito das diferentes concentrações de benzocaína e de óleo de cravo na anestesia de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 200 juvenis de tilápia, mantidos em período pré-experimental de quatro meses, num sistema de recirculação de água. Foram testadas cinco concentrações de benzocaína (60; 85; 110; 135; 160 mg/L) e cinco de óleo de cravo (60; 80; 100; 120; 140). Os experimentos foram conduzidos de maneira independente, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (concentrações de anestésico) e 20 repetições (peixes). Os dados obtidos foram submetidos a anava e teste de regressão linear, optando-se pela equação que melhor se ajustou aos dados observados. Os procedimentos experimentais foram realizados em dois aquários de vidro, um contendo a solução anestésica e outro contendo água pura, com volume de 15 L cada. Cada peixe foi avaliado individualmente, registrando-se o tempo de anestesia e recuperação, bem como seus respectivos estágios. No geral, à medida que se aumenta a dosagem de ambos os anestésicos, o tempo de indução diminui. A maioria dos estágios de recuperação não foi afetada pela concentração do anestésico ($P>0,05$), porém, no estágio 1, quando a concentração da benzocaína aumenta, o período de retorno neste estágio também é maior ($P<0,05$). Já para o óleo de cravo, quanto maior a dose, menor o tempo de permanência dos animais no estágio 1 da recuperação. Após avaliação de todos os dados, notamos que não existem um anestésico ideal e uma dosagem única que podem ser utilizados para todos os tipos de manejo. No entanto, as dosagens de 135 mg/L de benzocaína e 120 mg/L de óleo de cravo podem ser utilizadas na maioria dos procedimentos anestésicos em tilápias nilóticas.

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*. Anestesia. Tempo de indução. Concentração. Tempo de recuperação.

ABSTRACT

The experiments were conducted in the Fish Nutrition Laboratory of the Fish Farming Station of the Federal University of Lavras (UFLA) in order to evaluate the effect of different concentrations of benzocaine and clove oil to anesthetize the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). We used 200 juvenile tilapia that were maintained in a pre-trial period of four months in a water recirculation system. We tested five concentrations of benzocaine (60; 85; 110; 135; 160 mg/L) and five of clove oil (60; 80; 100; 120; 140). The experiments were conducted independently in a completely randomized design, with five treatments (anaesthetic concentrations) and 20 repetitions (fish). The data were submitted to ANOVA and linear regression test. We opted for the equation that best fitted the observed data. The experimental procedures were conducted in glass tanks two: one containing the anaesthetic and the other containing pure water, and the volume of water from each tank was 15 L. Each fish was individually evaluated, recording the duration of anaesthesia and recovery, as well as their respective stages. In general, with increasing dosage from both anaesthetics, the induction time decreases. Most stages of recovery was unaffected by the anaesthetic concentration ($P > 0.05$). However, in the first stage, when the concentration of benzocaine increases, the return period at this stage is also higher ($P < 0.05$). As for the clove oil, the higher the dose, the lower the residence time of the animals in the first stage of the recovery. After evaluating all data, we found that there is not an ideal anaesthetic and a single dosage unit that may be used for all types of management. However, doses of 135 mg / L of benzocaine and 120 mg / L of clove oil can be used in most anaesthetic procedures in Nile tilapia.

Keywords: *Oreochromis niloticus*. Anesthesia. Induction time. Concentration. Recovery time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Atuação de substâncias anestésicas no Sistema Nervoso Central.....	17
Figura 2	Estrutura química da triclaína (1), benzocaína (2) e ácido p-aminobenzóico (3).....	25
Figura 3	Estrutura química do eugenol.....	27
Figura 4	Foto ilustrativa dos aquários utilizados para as avaliações experimentais. Aquário (A): utilizado para anestesia dos peixes; Aquário (B): utilizado para recuperação dos peixes..	31
Figura 5	Comportamento de indução anestésica de juvenis de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>), em três fases de anestesia, submetidos a diferentes concentrações de benzocaína (1) e óleo de cravo (2).....	37
Figura 6	Comportamento de recuperação de juvenis de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>), em três fases de recuperação, submetidos a diferentes concentrações de benzocaína (1) e óleo de cravo (2).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos de anestesia local em animais.....	15
Tabela 2	Estágios de anestesia em peixes.....	20
Tabela 3	Concentrações dos anestésicos avaliados para tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	32
Tabela 4	Comportamento dos peixes que define os três estágios da indução à anestesia e recuperação.....	33
Tabela 5	Peso médio das tilápias utilizadas nos experimentos com benzocaína e óleo de cravo.....	35
Tabela 6	Período de permanência das tilápias anestesiadas com benzocaína e óleo de cravo nos diferentes estágios de insensibilização e tempo total gasto para completa indução à anestesia.....	36
Tabela 7	Período de permanência das tilápias anestesiadas com benzocaína e óleo de cravo nos diferentes estágios de recuperação e tempo total gasto para completa recuperação dos animais.....	42
Tabela 8	Diferença entre benzocaína e óleo de cravo no período de permanência em indução total, em anestesia e recuperação...	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Uso de anestésicos e termos técnicos.....	13
2.1.1 Anestesia local.....	14
2.1.2 Analgesia.....	16
2.2 Mecanismo de anestesia e reações fisiológicas.....	16
2.3 Estágios de anestesia.....	19
2.4 Dose anestésica, tempo de exposição e efeito obtido.....	21
2.5 Eutanásia.....	22
2.6 Substâncias anestésicas.....	23
2.6.1 Benzocaína.....	24
2.6.2 Óleo de cravo.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Local do experimento e período pré-experimental.....	29
3.2 Animais e manejo.....	29
3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	30
3.4 Substâncias anestésicas utilizadas e procedimentos experimentais.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Os procedimentos de rotina do processo produtivo aquícola como marcação de matrizes, transporte, aplicação de hormônios, vacinas e coleta de sangue e de tecidos para análise imprimem aos animais intenso desgaste. O estresse gerado pelo manejo pode evocar respostas fisiológicas que, dependendo da duração do evento e severidade do estressor, podem acometer a saúde e o desenvolvimento dos peixes. O uso de anestésicos para reduzir o estresse, facilitar o manuseio e nas intervenções dolorosas tem crescido nos últimos anos.

A utilização de determinados produtos químicos na piscicultura tem sido muito discutida entre os pesquisadores, sobretudo quando se trata de substâncias capazes de permanecer no metabolismo dos peixes destinados ao consumo humano. Atualmente no Brasil, não há legislação definida a respeito da utilização de anestésicos na aquicultura. As regulamentações de outros países são frequentemente consultadas para orientar o emprego destas substâncias.

A partir da década de 1930, diversos agentes químicos com propriedades sedativas, de origem sintética ou natural, começaram a ser utilizados em animais e vêm sendo testados ainda hoje. A escolha de um determinado anestésico é influenciada por alguns fatores, tais como preço, disponibilidade no mercado, eficiência, finalidade de uso e destino do animal caso haja algum efeito residual comprovado após a utilização da droga.

Países como os Estados Unidos da América (EUA), Noruega, Nova Zelândia, Austrália e Chile já possuem regulamentação para uso de anestésicos e indicam as formulações certificadas. Nesses países, os peixes destinados ao consumo humano e que tenham sido anestesiados com triclaína e benzocaína, por exemplo, necessitam de um período de depuração de 21 dias, até que possam ser liberados para o consumo humano.

Desta forma, visando ao uso eficiente e seguro destas substâncias, assim como a sua regulamentação, é fundamental que se realizem estudos que envolvam desde os primeiros procedimentos de aplicação de anestésicos até o processamento final do pescado.

Tendo em vista essa necessidade, o presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes fases de indução e recuperação da anestesia em juvenis de tilápia nilótica submetidas a diferentes concentrações de benzocaína e de óleo de cravo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso de anestésicos e termos técnicos

Os primeiros relatos de anestésicos datam do século XIII, com a descoberta do éter, por Raimundo Lúlio. Entretanto, somente no século XVI, a primeira confirmação de função anestésica foi descrita por Frobenius e Cordus. Horace Wells, que utilizou o gás do riso e Morton, que utilizou éter em uma extração dentária, são considerados os pais da anestesia (MASSONE, 2008).

O primeiro relato do uso de anestésicos em peixe é da década de 1930. Desde então, foram estudados diversos agentes químicos e diferentes procedimentos para insensibilização de peixes (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004).

O termo anestesia tem uma derivação grega, significando perda de sensibilidade ou insensibilidade, isto é, algo que determina uma diminuição, em níveis seguros, das funções fisiológicas específicas como a dor (anestesia local) e a consciência, isto é, um sono induzido e relaxamento muscular (anestesia geral) (MASSONE, 2008).

O uso de anestésicos tem se tornado cada vez mais comum em pisciculturas e nos procedimentos de pesquisa. Inúmeras operações realizadas na produção de organismos aquáticos como transporte, aplicação de hormônios e medicamentos, bem como a coleta de sangue e tecidos stressam os animais (ACERETE et al., 2004; FRISCH; ANDERSON, 2000; MYLONAS et al., 2005; RUANE et al., 2002). As substâncias anestésicas têm sido empregadas na tentativa de amenizar possíveis efeitos negativos destas práticas no desenvolvimento dos peixes. No processo de anestesia, termos técnicos como sedação, anestesia e narcose são empregados e, muitas vezes, esta prática dá origem a controvérsias entre os pesquisadores. De forma geral, o termo

“sedação” (definido como efeito calmante) consiste num estado preliminar de anestesia, onde a sonolência é induzida, podendo afetar levemente a percepção sensorial, com possível ocorrência de analgesia (insensibilidade à dor), porém, sem perda brusca da percepção sensorial ou do equilíbrio. O termo “sedativo” é sinônimo de calmante ou sedante. Quando um sedativo é capaz de diminuir a dor, recebe o nome de analgésico. A anestesia total ou geral pode ser definida como "perda reversível generalizada da percepção sensorial, acompanhada de um estado *sleeplike*, ou seja, sono induzido por drogas ou por agentes físicos" (HEAVNER, 1981, p. 41). Green (1979) observa que a anestesia total envolve um estado de depressão geral do Sistema Nervoso Central (SNC), envolvendo hipnose, analgesia, supressão da atividade de reflexo e relaxamento da musculatura voluntária. O termo “narcose” é também frequentemente empregado em procedimentos anestésicos, bem como para discutir agentes anestésicos. O agente narcótico é definido como um "indutor do sono", cujo efeito varia de acordo com a força e a quantidade do agente administrado. No trabalho com animais, a anestesia sempre pressupõe que a recuperação pode ocorrer, enquanto a narcose pode ser utilizada quando a recuperação não está prevista. Como mencionado anteriormente, há uma sobreposição excessiva no uso destes termos, uma vez que “narcose” e “anestesia” são essencialmente sinônimos (ROSS; ROSS, 2008).

2.1.1 Anestesia local

Anestesia local pode ser definida como uma técnica para produzir a perda reversível da sensação em uma região definida do corpo, sem afetar a consciência. Normalmente, uma pequena parte do corpo é alvo da anestesia. Entretanto, as substâncias utilizadas para este fim também podem anestésias uma parte maior do corpo. Anestésicos locais são administrados diretamente na área

desejada, não havendo necessidade de absorção pela corrente sanguínea para que sejam eficazes. Podem ser administrados por injeção ou pela aplicação da droga na superfície local, geralmente a pele. Os anestésicos locais produzem um bloqueio na propagação dos potenciais de ação nos receptores e nervos próximos ao local escolhido, impedindo a transmissão de qualquer estímulo doloroso para o sistema nervoso central e interrompendo a ação muscular. Além das drogas, a anestesia local também pode ser produzida por meio de hipotermia, aplicada localmente, ou por técnicas envolvendo corrente elétrica, acupuntura, aplicação de pressão e até hipnose, embora muitos destes métodos não sejam eficazes em animais aquáticos (ROSS; ROSS, 2008). Na Tabela 1, são apresentados alguns métodos que podem ser utilizados para anestesia local em animais.

TABELA 1 Métodos de anestesia local em animais.

NATUREZA DO MÉTODO	TÉCNICA
Física	Hipotermia Estimulação elétrica Acupuntura Pressão local
Química (drogas)	Inalação
	Parenteral:
	• Intravenosa
	• Intraperitonal
	• Intramuscular
	Oral
	Retal
Piscicológica	Hipnose

Fonte: Ross e Ross (2008)

2.1.2 Analgesia

Analgesia é o alívio da dor. É um bloqueio da percepção da dor, com ou sem a retenção de outras habilidades sensoriais e com ou sem o controle contínuo da função motora. Ela normalmente não resulta em perda de equilíbrio. Em animais, é refletida por uma redução da resposta a estímulos nocivos. Quando tratamos de animais, temos dificuldade de interpretar os sinais peculiares emitidos por alguns deles como sentimento de dor, por exemplo. Alguns animais não são capazes de expressar a dor da mesma forma que os seres humanos e, por este motivo, a analgesia em animais tende a ser de difícil julgamento. Outro fator complicante em animais é que a resposta a estímulos nocivos comumente pode sofrer alterações e novas respostas podem ser aprendidas (ROSS; ROSS, 2008).

Em geral, o alívio da dor ou analgesia em animais aquáticos pode ser detectada quando o animal não apresenta os sinais interpretados como estado de dor, ou quando os sinais de resposta à dor estejam acentuadamente reduzidos. Sinais físicos e respostas motoras têm sido usados como indicadores de analgesia. O desenvolvimento de equipamentos clínicos e de metodologias para avaliação dos parâmetros fisiológicos contribuíram para tornar os métodos para avaliação da analgesia mais confiáveis e, em muitos destes estudos, faz-se uso do monitoramento por eletroencefalograma.

2.2 Mecanismo de anestesia e reações fisiológicas

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).

Através da atuação nos axônios neuronais (Figura 1), os anestésicos deprimem o Sistema Nervoso Central (SNC) ao atingi-lo. No entanto, pouco se sabe sobre o modo preciso de ação dos anestésicos em peixes. Acredita-se, porém, que este 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 consequente redução na quantidade de neurotransmissor liberado pelo impulso nervoso, assim como depressão dos receptores pós-sinápticos (ROSS; ROSS, 2008).

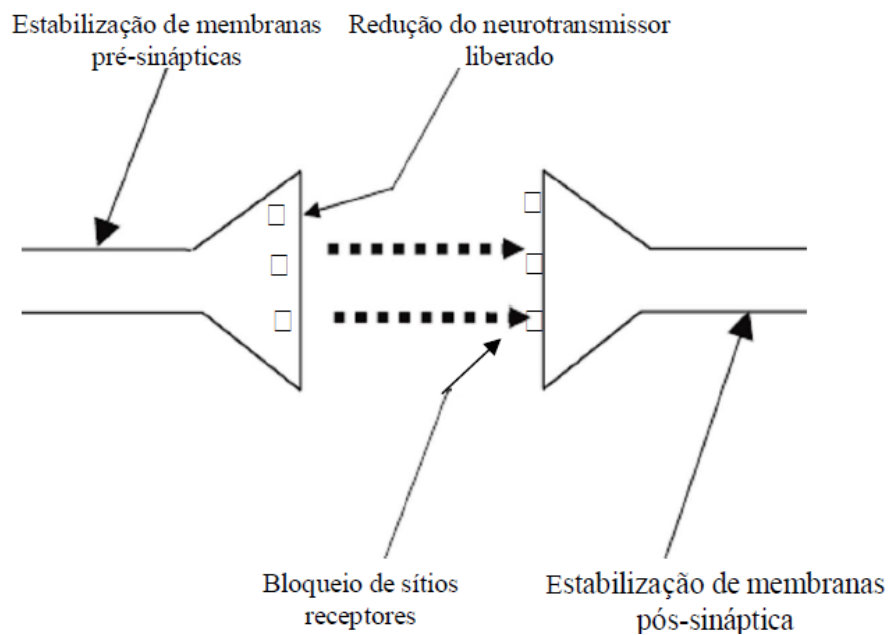


FIGURA 1 Atuação de substâncias anestésicas no Sistema Nervoso Central (ROSS; ROSS, 2008).

A capacidade de interferir sobre o eixo HHI (Hipotálamo – Hipófise – Inter-renal) como mitigador das respostas ao estresse tem sido um parâmetro norteador para a escolha dos anestésicos (PALIC et al., 2006). Diversos estudos comprovam que a utilização de sedativos reduz a concentração de corticoides (cortisol) e catecolaminas na circulação sanguínea, durante manejos estressantes.

O estresse em animais vertebrados desencadeia alterações coordenadas por centrais sensoriais especializadas, as quais canalizam a informação diretamente para o hipotálamo, estimulando a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e ativando o eixo HHI (Hipotálamo – Hipófise – Inter-renal), com estimulação da liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela glândula pituitária. Este hormônio atua no tecido inter-renal, que responde com a liberação de corticoides na corrente sanguínea (OLSEN; EINARSDOTTIR; NIELSSEN, 1995; SHAVIT et al., 2005). Assim, os diferentes químicos podem atuar de várias formas: bloqueando os receptores da adrenalina (inibindo seu efeito), impedindo a ação dos transmissores sensoriais do hipotálamo, ou atuando diretamente nas células inter-renais (bloqueando os receptores de ACTH) e reduzindo a liberação de corticoides (GERWICK; DEMERS; BAYNE, 1999; OLSEN; EINARSDOTTIR; NIELSSEN, 1995; SANDODDEN; FINSTAD; IVERSEN, 2001).

A redução do movimento muscular durante a anestesia ocorre em função de um efeito direto do anestésico sobre os nervos, na musculatura lisa e no músculo cardíaco. Esse efeito pode causar consequências perigosas aos peixes, sobretudo quando estiver relacionado ao distúrbio cardíaco (ROTHWELL et al., 2004).

O batimento cardíaco tem uma frequência controlada por diversos fatores metabólicos, os quais podem sofrer interferência na presença de agentes anestésicos, levando a um quadro de arritmia cardíaca. Esses agentes químicos bloqueiam nervos, incapacitando a contração muscular, o que prejudica a

circulação sanguínea (HILL; DAVISON; FORSTER, 2002; ROTHWELL et al., 2004).

O movimento branquial é influenciado por inúmeros fatores, tais como íons reguladores, hormônios, nervos e batimento cardíaco. As brânquias cessam o movimento à medida que o químico atinge os nervos e o coração, reduzindo a circulação sanguínea e levando à parada respiratória (HILL; DAVISON; FORSTER, 2002). Esse processo desacelera o metabolismo do peixe, reduzindo a sua exigência por oxigênio (COOKE et al., 2004).

A avaliação do grau de insensibilização em peixes pode ser feita mediante observação do comportamento do animal, tanto para a indução, quanto para a recuperação. A aplicação desta metodologia é de grande importância quando se deseja medir a mortalidade posterior à recuperação, além de não causar nenhum estresse adicional ao animal durante o processo de anestesia. O procedimento é utilizado pela maioria dos pesquisadores, com pequenas adaptações para diferentes objetivos (BURKA et al., 1997; HOSKONEN; PIRHONEN, 2004; KEENE et al., 1998; MASSEE et al., 1995; WALSH; PEASE, 2002).

2.3 Estágios de anestesia

Os estágios progressivos de sedação e anestesia foram descritos e adaptados pela primeira vez para peixes por McFarland (1959). A base de seu esquema descritivo está representada na Tabela 2. Observa-se que uma substância anestésica pode produzir sedação, anestesia cirúrgica ou morte, dependendo da combinação, da dose e do tempo de exposição dos animais.

TABELA 2 Estágios de anestesia em peixes.

Estágios	Fases	Sinais fisiológicos e comportamentais
I	Sedação	Responsivo aos fortes estímulos porém com o movimento reduzido ventilação diminuiu.
II	Anestesia Leve	Perda parcial de equilíbrio; forte analgesia; perda total do tônus muscular, perda total de ventilação e equilíbrio quase ausente.
III	Anestesia profunda ou cirurgica	Perda total de reação mesmo a fortes estímulos.
IV	Colapso Medular	Parada respiratória, parada cardíaca, eventual morte, overdose.

Fonte: Ross e Ross (2008).

Na prática, algumas espécies de peixe não se encaixam perfeitamente na descrição de McFarland. As três principais fases foram descritas por muitos pesquisadores ao longo dos anos, porém, sem muita consistência. Cada uma destas fases possui uma variação no tempo de duração, de acordo com a droga ou método utilizado, espécie alvo, bem como sua condição fisiológica no momento da anestesia. Durante a indução, o animal é exposto ao agente anestésico para atingir o estágio desejado. A indução é muitas vezes acompanhada por alta atividade locomotora, que é uma resposta à sensação ou propriedades ligeiramente irritantes da droga, devendo durar apenas alguns segundos. Em geral, a indução deve ser rápida e com baixa ou nenhuma hiperatividade acentuada (ROSS; ROSS, 2008). O animal deverá apresentar uma sucessão de sinais indicados na Tabela 2, como perda do movimento ou ataxia, perda de reflexo, incapacidade de se manter na posição correta na coluna d'água e, posteriormente a estes eventos, anestesia profunda, sem reação a qualquer estímulo.

A fase de recuperação envolve a retirada do agente anestésico, com subsequente retorno do animal ao estado normal. A recuperação inicial pode ocorrer em alguns segundos ou minutos, mas, geralmente, deve ser um processo rápido e sem alteração de comportamento ou outros efeitos colaterais, embora a ocorrência de tremores musculares seja comum. O animal tenta endireitar-se e começa a responder ao ruído ou a outros estímulos sensoriais. Nos peixes, o posicionamento normal do animal na coluna d'água muitas vezes pode ser alcançado por meio de um estímulo forte (ROSS; ROSS, 2008).

2.4 Dose anestésica, tempo de exposição e efeito obtido

O efeito total do anestésico dependerá da dose ou quantidade de substância utilizada, bem como da duração da exposição a esse agente. Se o agente é muito forte ou se a quantidade utilizada for excessiva, o animal vai passar rapidamente e de forma indiferenciada por todas as fases da anestesia. Em concentrações mais baixas, uma condição pode ser alcançada quando a taxa de depuração é igual à taxa de absorção, sendo possível manter um estado estável em seguida. É muito importante compreender a relação entre a dose, o tempo de exposição e o estágio anestésico alcançado para garantir um bom controle do processo, particularmente importante durante o banho de anestesia comumente utilizado para animais aquáticos. O grau e a natureza da analgesia alcançados e a facilidade de recuperação também são extremamente importantes. Infelizmente, para a maioria dos agentes anestésicos, descrições adequadas de todos estes recursos são raras (ROSS; ROSS, 2008).

A avaliação da analgesia é extremamente importante, entretanto, raramente é feita. Na maioria dos casos, a analgesia é eficaz, pois o animal é

imobilizado. Isto pode ser uma suposição razoável com algumas classes de anestésicos, mas não pode ser atribuída a todos as situações.

2.5 Eutanásia

Em algumas situações, pode ser necessário abater os animais, seja para encerrar um procedimento experimental, seja para a coleta de tecidos, eliminação de animais excedentes ou para aliviar a aflição, procedimento que deve ocorrer conforme as normas de bioética. Tal procedimento é conhecido como eutanásia e deve ser realizado com o mínimo de sofrimento físico e mental aos animais.

Existem duas abordagens possíveis para a eutanásia : física ou química. Métodos físicos envolvem um forte golpe no crânio, de modo a provocar a perda imediata da consciência e, provavelmente, a morte (HER MAJESTY'S STATIONARY OFFICE - HMSO, 1997). Esta técnica é usualmente aplicada em peixes, sendo muito eficaz. Métodos químicos envolvem o uso de uma *overdose* de anestésico, administrado por injeção ou imersão, empregando-se uma dose adequada ao tamanho, estágio de desenvolvimento e espécie animal. Nos Estados Unidos, dentre os agentes recomendados, estão os barbitúricos, benzocaína, 2-fenoxietanol e o MS-222 (tricaina metanossulfato) ((AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION - AVMA, 2001), embora claramente tais substâncias não possam ser utilizadas em animais destinados ao consumo humano.

Holloway et al. (2004) compararam os efeitos da eutanásia usando óleo de cravo, MS-222 e atordoamento sobre os níveis de cortisol plasmático, glicose, hormônio de crescimento e dois hormônios da tireóide, a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4). O cortisol plasmático e a glicose aumentaram significativamente em animais eutanasiados com uso do método de atordoamento, enquanto a

eutanásia dos peixes feita com óleo de cravo ou MS-222 não refletiu um aumento relevante nesses parâmetros. Os níveis de hormônio do crescimento, T3 e T4 não foram afetados pelos métodos de eutanásia avaliados. Esses resultados demonstram a importância de pesquisar os efeitos de qualquer novo agente anestésico ou método de eutanásia sobre parâmetros sanguíneos e teciduais dos animais.

2.6 Substâncias anestésicas

Atualmente, os anestésicos mais utilizados na aquicultura são a tricaina matanossulfato (MS-222, nos Estados Unidos e TMS, no Canadá), benzocaína, quinaldina, metomidato, 2-fenoxietanol, mentol, óleo de cravo ou formulações contendo seu ingrediente ativo, o eugenol (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004; ROSS; ROSS, 2000).

Um anestésico pode ser considerado ideal quando reúne algumas características, tais como atuação rápida (cerca de três minutos); curto tempo de recuperação (cerca de cinco minutos); facilidade na aplicação; baixo risco para os animais e para o ser humano; dosagens utilizadas e contidas numa ampla margem de segurança; não deve causar efeitos persistentes na fisiologia dos peixes e em seu comportamento quando utilizado de forma contínua; deve ser rapidamente metabolizado ou excretado, minimizando ou eliminando resíduos do organismo; a ação do sedativo deve ser passageira, não persistindo no metabolismo animal (KEENE et al., 1998).

A farmacocinética das drogas no metabolismo animal pode ser fortemente influenciada por fatores como temperatura da água, tamanho do animal, espécie, oxigênio disponível e estado fisiológico (HANAWA et al., 1998; WOODY; NELSON; RAMSTAD, 2002). Diversas pesquisas têm sido

realizadas com a finalidade de definir procedimentos de anestesia, assim como a droga e a concentração mais indicadas para cada espécie de peixe.

Em sua maioria, as metodologias utilizadas para insensibilização de peixes se baseiam na imersão dos animais em uma solução de água contendo o anestésico (MYSZKOWSKI; KAMINSKI; WOLNICKI, 2003). A escolha do agente químico é orientada a partir da consideração de fatores como a disponibilidade do produto no mercado, sua viabilidade, objetivo, facilidade e segurança de uso (CHO; HEATH, 2000; SOTO; BURHANUDDIN, 1995).

A disponibilidade dos anestésicos muda conforme a região. No Brasil, a obtenção de alguns anestésicos pode se tornar inviável em função de sua produção escassa ou preço elevado.

2.6.1 Benzocaína

Assim como a tricafina metanossulfato, a benzocaína é um composto derivado do ácido p-aminobenzóico (Figura 2). Em virtude de seu caráter lipofílico, tais substâncias podem ser acumuladas nos tecidos dos peixes destinados ao consumo humano. Comparados aos peixes tropicais, este acúmulo é maior em peixes de água fria, pois estes apresentam metabolismo menos acelerado e uma proporção maior de lipídios (WALSH; PEASE, 2002)..

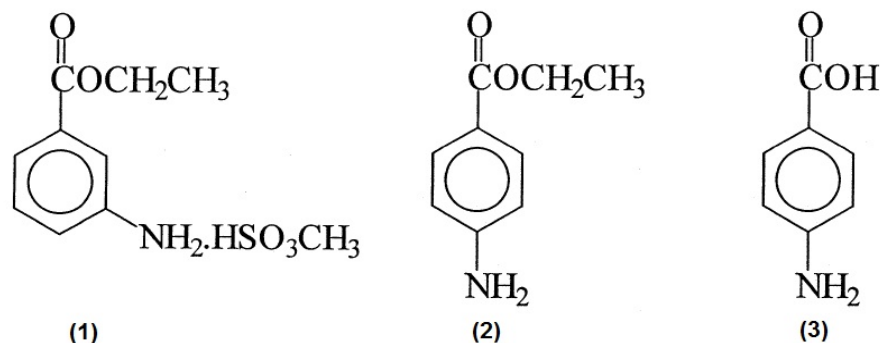


FIGURA 2 Estrutura química da tricaina (1), benzocaína (2) e ácido p-aminobenzóico(3).
Fonte: Ross e Ross (2008)

A benzocaína é um anestésico insolúvel, mundialmente utilizada como anestésico local na medicina veterinária e humana, não sendo considerada, portanto, uma substância tóxica para os seres humanos, quando utilizada nas concentrações adequadas (STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 2000). Trata-se de um composto de fácil acesso e de baixo custo, além de satisfazer a maioria das características desejadas em um agente químico ideal (FAÇANHA; GOMES, 2005). É eficiente para a maioria das espécies e possui ampla margem de segurança durante sua aplicação, tanto para peixes, quanto para humanos (BURKA et al., 1997).

A utilização destas substâncias sedativas na aquicultura ainda é questionada, pois faltam estudos sobre seu efeito residual (MUNDAY; WILSON, 1997).

Allen (1988 citado por ROSS; ROSS, 2008), relata que, após a exposição a 50 mgL L⁻¹ de benzocaína, por 15 minutos, os níveis residuais no tecido de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram de 14 µg g⁻¹. Geralmente, 24 horas após a anestesia, os níveis residuais desta droga no tecido não são detectados. Já na farinha de peixe preparada a partir de animais previamente

anestesiados, o resíduo de benzocaína encontrado foi de aproximadamente $45 \mu\text{g g}^{-1}$, em peso seco.

Não existem leis que regulamentam o uso de anestésicos para peixes comerciais no Brasil. Assim, procura-se seguir as recomendações de países com regulamentos já definidos (FAÇANHA; GOMES, 2005). Na Noruega, por exemplo, a regulamentação determina um período de 21 dias de depuração após o tratamento com benzocaína, antes do pescado ser consumido. Quando utilizada em animais na Noruega, nos Estados Unidos e no Canadá, a tricaina metanossulfato também requer um período de depuração para que o filé do peixe anestesiado possa ser consumido. Um levantamento recente mostra que até abril de 2011 não havia sido estabelecida nenhuma recomendação a respeito dos níveis seguros de resíduos de benzocaína e tricaina metanossulfato em peixes destinados ao consumo humano (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2011).

Há uma grande preocupação a respeito do descarte da solução anestésica após o uso, bem como de seus efeitos no ambiente. Uma pesquisa feita por Howe, Bills e Marking (1990) descreveu técnicas práticas para a absorção de benzocaína de efluentes agrícolas, usando filtragem com carbono ativado. Esta abordagem não tem sido amplamente explorada, mas pode ser uma consideração importante no tratamento deste resíduo, antes que seja descartado no ambiente.

2.6.2 Óleo de cravo

Os principais anestésicos naturais utilizados em peixes são o óleo de cravo e o mentol (PALIC et al., 2006). O óleo de cravo é destilado das flores, caules e folhas de *Syzygium aromaticum* (ou *Eugenia aromaticum*) ou *Eugenia caryophyllata*. É um líquido marrom com odor e sabor acentuados. O conteúdo total de óleo em cravos (de boa qualidade) chega a 15%. O óleo é constituído,

basicamente, por eugenol (70 a 80%), acetato de eugenol (15%) e beta-cariofileno (5 a 12%).

O eugenol é um composto aromático que está presente nos cravos, canela, sassafrás e mirra. A nomenclatura IUPAC para o eugenol é *4-Alil-2-Metoxifenol* e o número CAS é *97-53-0*. Esta substância tem sido utilizada como anestésico desde a antiguidade, principalmente para ajudar a minimizar dores de dente, de cabeça e dores nas articulações .

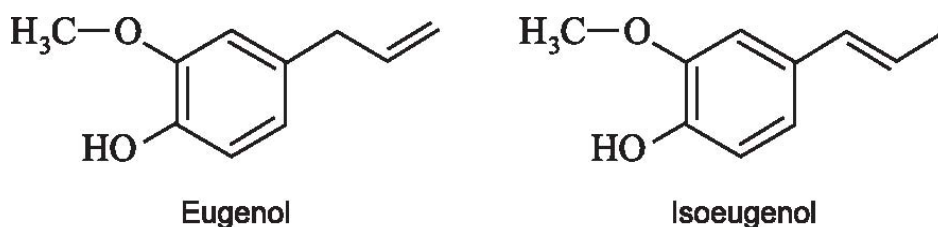


FIGURA 3 Estrutura química do eugenol e isoeugenol (ROSS; ROSS, 2008).

Apesar de eficaz, a anestesia com óleo bruto de cravo deve ser evitada, pois pode deixar forte odor e sabor residual. Todavia, o produto purificado não apresenta tal inconveniente (ROSS; ROSS, 2008).

O óleo de cravo e seu princípio ativo eugenol são praticamente insolúveis em água, sendo necessário o preparo de soluções estoque em etanol ou metanol.

Comercialmente é possível obter o eugenol puro (100%) e, em alguns países, já existem formulações comerciais contendo apenas isoeugenol (AQUI-S[®]) que, embora muito semelhante ao eugenol, não está presente no óleo de cravo natural.

Há muitos exemplos de uso óleo de cravo como anestésico em animais invertebrados e vertebrados. Vários relatos científicos sobre o uso de óleo de cravo e de eugenol como anestésicos para peixes já se encontram disponíveis para pesquisa.

Na verdade, o óleo de cravo e o eugenol são classificados pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) para odontologia e como aditivo ou agente aromatizante em alimentos humanos e animais. Porém, é importante notar que estas substâncias ainda não estão aprovadas como medicamentos ou como anestésicos para peixes e permanecem sob investigação. Quando utilizados em peixes destinados ao consumo humano, recomenda-se um período de carência de 21 dias, segundo o FDA (2011) e Ross e Ross (2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento e período pré-experimental

O experimento foi conduzido no laboratório de Nutrição de Peixes da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) de março a julho de 2010, sendo que, nesse período, quatro meses constituíram o período pré-experimental para adaptação dos animais, quando também atingiram o peso ideal e um mês destinado às avaliações experimentais.

3.2 Animais e manejo

Foram utilizados 200 juvenis machos invertidos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), mantidos em um sistema de recirculação de água termocontrolada (28°C), equipado com filtro de areia (com capacidade de reter partículas com 5 µm) e radiação ultravioleta para esterilização, filtro biológico e sistema de controle da temperatura (N540), com precisão de duas casas decimais. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 12 caixas de metabolismo de polipropileno, com capacidade para 250 L. Durante todo o período pré-experimental, os peixes foram alimentados *ad libitum*, com ração comercial contendo 32% de proteína bruta, fornecida duas vezes ao dia. As caixas foram sifonadas diariamente por 30 minutos após cada alimentação, para a retirada de restos de ração e excretas.

Os parâmetros liminológicos foram monitorados diariamente durante todo o período pré-experimental. A medição do pH foi realizada com um pHmetro digital portátil Bernauer® (modelo F-1005), o oxigênio foi mensurado com auxílio de um oxímetro digital portátil Bernauer® (modelo F-1550A) e a temperatura foi monitorada por uma sonda pt 100, ligada a um controlador de

temperatura (N540), acoplados ao sistema de recirculação de água do laboratório.

3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

Foram realizados dois experimentos independentes para avaliar a eficiência da benzocaína e do óleo de cravo como anestésicos para tilápias. Ambos os experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos (concentrações de anestésico) e 20 repetições (peixes) por tratamento, conforme modelo estatístico abaixo:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij},$$

em que:

y_{ij} = amostragem da parcela referente à concentração de anestésico i na repetição j ($i = 1, 2, \dots, 5$ e $j = 1, 2, 3, \dots, 20$);

μ = média geral do experimento;

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

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

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos à análise de variância com auxílio do software SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas) (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV, 2000), sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls), com 5% de probabilidade e os tempos de indução e recuperação dos peixes submetidos a estudo de regressão, com modelo $y = \alpha + a_0 + a_1x + a_2x^2$.

3.4. Substâncias anestésicas utilizadas e procedimentos experimentais

As substâncias anestésicas utilizadas em cada experimento foram a benzocaína e o óleo de cravo, com concentrações previamente testadas a partir dos resultados observados em outros trabalhos e estabelecidas por meio de um experimento piloto.

Os procedimentos de anestesia foram realizados no período diurno, em aquários de vidro com capacidade para 40 L, preenchidos com 15 L de água (Figura 4).

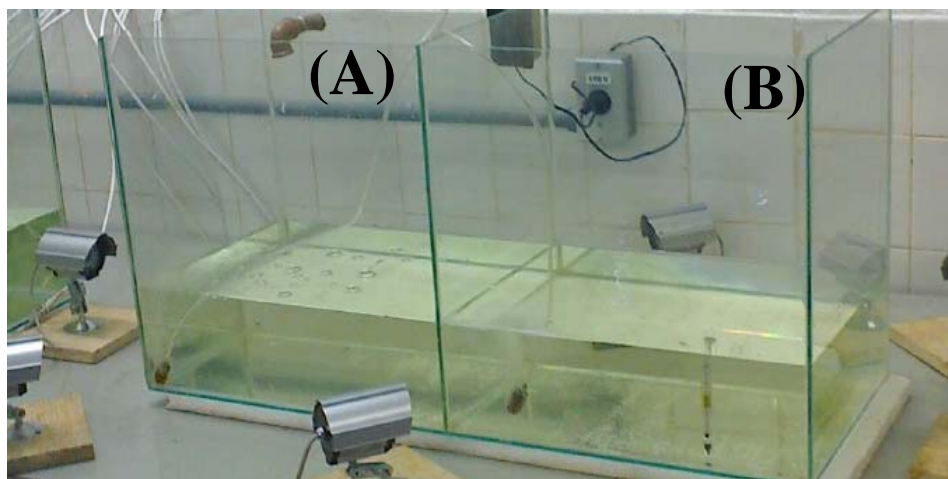


FIGURA 4 Foto ilustrativa dos aquários utilizados para as avaliações experimentais. Aquário (A): utilizado para anestesia dos peixes; Aquário (B): utilizado para recuperação dos peixes.

Dois anestésicos e cinco concentrações foram testados a fim de determinar a sua influência na indução anestésica e na recuperação dos animais, conforme apresentado na Tabela 3.

TABELA 3 Concentrações dos anestésicos avaliados para tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

Anestésicos	Concentração de anestésico por litro de água				
	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose 4	Dose 5
Benzocaína (mg)	60	85	110	135	160
Óleo de cravo (mg)	60	80	100	120	140

Durante o teste piloto foi feito um ensaio com diluições em álcool (92,8°GL), com ambos anestésicos. As diluições, em 15 mL de álcool, para o óleo de cravo, e 22 mL de álcool, para a benzocaína, mostraram-se adequadas para todas as concentrações avaliadas.

As 12 caixas onde os animais foram mantidos durante o período pré-experimental foram numeradas sequencialmente de 1 a 12, e os animais foram coletados aleatoriamente dentro de cada caixa, seguindo uma ordem crescente na numeração das caixas, sendo que ao retirar um animal da caixa número 1, esta só forneceria o segundo animal após a retirada de um animal em cada uma das 11 caixas restantes.

Para cada dosagem anestésica avaliada, foram utilizados 20 peixes (n = 20), submetidos individualmente ao banho anestésico, totalizando 100 animais por cada anestésico estudado.

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 Ross e Ross (2000), adaptado por Small (2003), conforme mostrado na Tabela 4.

TABELA 4 Comportamento dos peixes que define os três estágios da indução à anestesia e recuperação.

Estágios	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

Ross e Ross (2000) adaptado por Small (2003).

Os sinais peculiares de indução à anestesia e recuperação dos animais foram registrados por meio de análise visual e monitorados por câmeras acopladas aos aquários. Com o objetivo de avaliar a recuperação da anestesia, quando os peixes atingiram o estágio anestésico 3 (anestesia profunda), foram retirados do aquário de indução, pesados e transferidos para outro aquário de vidro, com as mesmas dimensões, preenchido com 15 L de água isenta de anestésico. O tempo gasto até o animal atingir os estágios de anestesia e de recuperação foi cronometrado e registrado.

A água do aquário contendo anestésico foi trocada após a anestesia de cinco peixes, para evitar uma variação na concentração da droga. Da mesma forma, a água do aquário de recuperação foi renovada para evitar o acúmulo de resíduos do anestésico, aderidos à superfície do animal no momento da troca de aquários (de anestesia para recuperação) e dos metabólitos eliminados pelos animais.

A temperatura da água foi mantida constante (28°C) e o ambiente onde se encontravam os aquários foi mantido fechado, para evitar oscilação da temperatura ambiental. A oxigenação da água dos aquários foi feita com auxílio de sopradores de ar conectados a uma pedra porosa.

O monitoramento da anestesia dos peixes foi feito por dois avaliadores devidamente treinados e cada avaliador foi responsável por duas repetições (Avaliador 1: repetição 1 e 3, avaliador: 2 repetição 2 e 4).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro dos níveis ideais para a espécie, com oxigênio dissolvido acima de $3,75 \pm 1,34$ mg/L, amônia abaixo de $0,03 \pm 0,02$ ppm/L, temperatura entre $27,8 \pm 0,3$ °C e pH entre $6,9 \pm 0,2$.

O peso médio dos animais utilizados nos experimentos encontra-se na Tabela 5.

TABELA 5	Peso médio das tilápias utilizadas nos experimentos com benzocaína e óleo de cravo.
Anestésicos	Peso médio (g) \pm Desvio Padrão
Benzocaína	$74,66 \pm 11,68$
Óleo de Cravo	$72,96 \pm 10,22197$

Os procedimentos de anestesia e recuperação aplicados durante todo o experimento não determinaram a mortalidade de peixes.

As concentrações de benzocaína e óleo de cravo avaliadas promoveram anestesia e recuperação dos animais dentro da margem definida como ideal para os anestésicos, máximo de três minutos para indução e de cinco minutos para recuperação proposta por King et al. (2005) e Ross e Ross (2008). Todas as doses empregadas proporcionaram aos avaliadores uma percepção nítida da transição entre os estágios de anestesia. De modo geral, com o aumento da concentração do anestésico, a transição entre os estágios de anestesia foi mais rápida nos períodos de indução e de recuperação ($P < 0,05$).

Kiessling et al. (2009), trabalhando com benzocaína e óleo de cravo também relataram a diminuição do tempo de anestesia à medida que se aumenta a dosagem anestésica utilizada.

Uma análise cuidadosa deve ser feita observando-se o tempo de permanência dos animais em cada estágio da anestesia. A Tabela 6 e a Figura 5 mostram o comportamento em cada etapa de indução anestésica das tilápias em diferentes concentrações de benzocaína e óleo de cravo.

TABELA 6 Período de permanência das tilápias anestesiadas com benzocaína e óleo de cravo nos diferentes estágios de insensibilização e tempo total gasto para completa indução à anestesia.

Concentração de benzocaína (mg/L)	Tempo de permanência (s)		Tempo total (s)
	Estágio 1	Estágio 2	
60	107,56 a	105,87 a	213,43 a
85	69,81 b	35,75 b	105,56 b
110	46,18 bc	21,25 b	67,43 bc
135	19,87 c	10,87 b	30,75 c
160	20,06 c	12,00 b	32,06 c

Concentração óleo de cravo (mg/L)	Tempo de permanência (s)		Tempo total (s)
	Estágio 1	Estágio 2	
60	64,87 a	110,18 a	175,06 a
80	51,25 b	46,81 b	98,06 b
100	51,37 ab	28,75 bc	80,12 b
120	35,25 b	18,75 c	54,00 c
140	28,06 b	22,06 c	50,12 c

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo testes SNK ($P < 0,05$).

Tempo Total = Estágio 1 + Estágio 2.

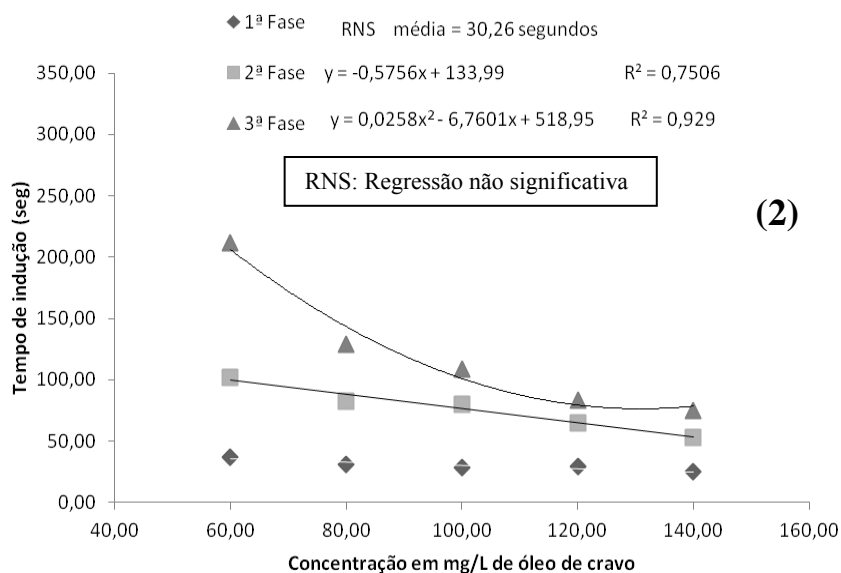
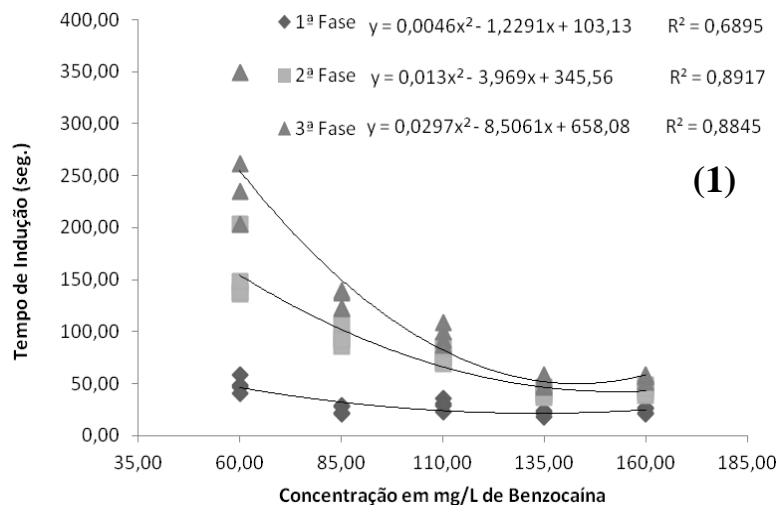


FIGURA 5 Comportamento de indução anestésica de juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*), em três fases de anestesia, submetidos a diferentes concentrações de benzocaína (1) e óleo de cravo (2).

Ao analisarmos o tempo de indução em cada fase de anestesia, é possível observar que na 1^o fase, os animais anestesiados com benzocaína tendem a diminuir o tempo gasto para iniciar este estágio em função da concentração anestésica utilizada, ou seja, quanto maior a dose do anestésico, menor o tempo gasto para o início do estágio 1 de indução. Esse efeito não foi observado nos animais anestesiados com óleo de cravo, onde a concentração não influenciou o tempo gasto para o início da 1^o fase ($P>0,05$). O tempo gasto para que cada peixe apresente os sinais iniciais do processo de anestesia tem grande variação individual, pois há animais que apresentam uma maior resistência a estas drogas, enquanto outros são mais sensíveis aos seus efeitos (Figura 5).

O estágio 1 de anestesia é definido a partir dos sinais característicos desta fase, descritos por Ross e Ross (2000). Neste período, os peixes anestesiados com 60 mg/L de benzocaína e óleo de cravo permaneceram um maior tempo (107,56 e 64,87 segundos, respectivamente) ($P<0,05$). Quando utilizamos concentrações anestésicas mais elevadas (135 e 160 mg/L de benzocaína e 80, 120 e 140 mg/L de óleo de cravo), este período é bastante reduzido (19,87 e 20,06 segundos, para benzocaína e 51,25; 35,25 e 28,06 segundos, para óleo de cravo). Entretanto, nestas concentrações mais elevadas não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) dentro do mesmo anestésico. A concentração de 85 mg/L de benzocaína determinou um tempo de permanência intermediário na fase 1 de anestesia, comparado ao tempo de permanência dos animais submetidos a doses maiores e menores ($P<0,05$). A concentração de 110 mg/L de benzocaína não foi estatisticamente diferente das maiores doses (85, 135 e 160 mg/L), assim como a concentração de 100 mg/L de óleo de cravo não se diferenciou das demais concentrações deste anestésico (Tabela 6).

O tempo de indução na segunda fase de anestesia foi afetado pelas diferentes concentrações dos dois anestésicos estudados. À medida que a

concentração aumenta, o tempo gasto para atingir a segunda fase decresce. Esse efeito foi mais evidente para os animais submetidos às soluções contendo óleo de cravo. Porém, ao analisarmos os efeitos referentes às concentrações mais elevadas de benzocaína (135 e 160 mg/L), podemos observar uma tendência à estabilização do tempo de indução, em função da dose anestésica (Figura 5).

O segundo estágio de anestesia perdura até que o animal esteja completamente anestesiado. Neste trabalho, durante o segundo estágio, os animais tratados com 85, 110, 135 e 160 mg/L de benzocaína e 120 e 140 mg/L de óleo de cravo alcançaram um tempo de permanência muito menor que as concentrações de 60 mg/L de benzocaína e 60 mg/L de óleo de cravo. Os peixes anestesiados com 85, 110, 135 e 160 mg/L de benzocaína, cujos tempos médios de permanência no estágio 2 foram de 35,75; 21,25; 10,87 e 12,00 segundos, respectivamente, registraram um tempo que pode ser oito vezes menor que os animais anestesiados com 60 mg/L (105,87 segundos) (Tabela 6).

Já para óleo de cravo, as maiores concentrações (120 e 140 mg/L, com tempo de 18,75 e 22,06 segundos) proporcionaram uma redução de 5,87 vezes no tempo do estágio 2, quando comparadas à dosagem de 60 mg/L (110,18 segundos). A dose de 80 mg/L anestesiou os animais cerca de 46,81 segundos mais rapidamente do que a concentração de 60 mg/L (110,18 segundos), sendo entretanto, mais lenta do que as concentrações de 120 mg/L (18,75 segundos) e de 140 mg/L (22,06 segundos).

Uma medida indireta do estresse é a avaliação da concentração de catecolaminas e corticosteroides. Portanto, quanto maior a concentração desses metabólitos, maior será o estresse do animal. A liberação de corticosteroides e de catecolaminas relacionada à ação do anestésico se concentra no estágio 2 de anestesia. Portanto, quanto mais breve for a passagem do animal por essa etapa, menor é a liberação destas substâncias pelo organismo (OLSEN; EINARSDOTTIR; NILSSEN, 1995; ROTHWELL et al., 2005). No entanto, o

mecanismo envolvido neste processo ainda não está totalmente esclarecido para peixes e mais estudos devem ser realizados para outros agentes anestésicos. O emprego de substâncias anestésicas com o objetivo de mitigar os efeitos do estresse numa determinada situação requer a sua utilização em concentrações adequadas para que o efeito obtido não seja oposto ao pretendido (OKAMURA et al., 2008).

O início do terceiro estágio de anestesia também foi afetado pela concentração do anestésico, como também observado durante o segundo estágio. Portanto, quanto maior a concentração do anestésico, menor o tempo necessário para que o animal atinja o estágio 3. Entretanto, as concentrações mais elevadas de benzocaína (135 e 160 mg/L) e de óleo de cravo (120 e 140 mg/L) apresentaram uma tendência a estabilizar o tempo em função da dose (Figura 5).

Okamura et al. (2008), trabalhando com juvenis de tilápia nilóticas anestesiadas com benzocaína, encontraram resultados semelhantes a estes, onde doses acima de 130 mg/L não apresentaram efeito significativo.

Neste trabalho, o intervalo de tempo entre a exposição à droga e a manifestação dos sinais característicos do estágio 3 de anestesia foi denominado tempo total. Nesta fase, as doses de 135 e 160 mg/L de benzocaína e de 120 e 140 mg/L de óleo de cravo foram as que anestesiaram em menor tempo (30,75 e 32,06 segundos, para benzocaína e 54 e 50,12 segundos, para o óleo de cravo). Tanto para benzocaína, quanto para óleo de cravo, a concentração de 60 mg/L foi a mais ineficiente entre as testadas, pois a anestesia só foi alcançada com 213,43 e 175,06 segundos, com uso de benzocaína e óleo de cravo, respectivamente.

A concentração de 85 mg/L de benzocaína e de 80 e 100 mg/L de óleo de cravo determinaram a ação intermediária no processo de anestesia, sendo mais eficientes que a dose inicial de 60 mg/L para os dois anestésicos estudados. Entretanto, quando comparadas às concentrações superiores (110, 135, 160

mg/L de benzocaína e 120 e 140 mg/L de óleo de cravo), estas promoveram um maior período para anestesia total (Tabela 6).

Também neste estudo, o terceiro estágio da anestesia foi denominado período de permanência em anestesia e representa o limite entre a anestesia reversível e o colapso medular, que leva o animal a óbito. É nesta fase que os animais permanecem sob efeito maior da droga, apresentando alto grau de insensibilização. Neste trabalho, a permanência dos juvenis de tilápia em anestesia profunda foi maior quando estes animais foram submetidos a procedimentos anestésicos com 100 e 120 mg/L de óleo de cravo (com tempo de 79,63 e 73,31 segundos, respectivamente), não havendo diferenças significativas entre essas concentrações ($P > 0,05$). A benzocaína, quando utilizada nas doses de 135 e 160 mg/L manteve os animais em anestesia profunda por 43,94 e 56,31 segundos, respectivamente, sendo este período menor do que o determinado pelo uso de óleo de cravo.

Frequentemente, em pesquisas com anestésicos, são utilizados diferentes estágios de indução como parâmetros de eficiência. Entretanto, apesar de sua grande importância prática, os estágios de recuperação são pouco explorados.

Neste trabalho, o tempo de recuperação dos peixes após a anestesia foi influenciado pela concentração da substância anestésica ($P < 0,05$). A Tabela 7 e Figura 6 mostram o comportamento de recuperação da condição de anestesia das tilápias, em diferentes concentrações de benzocaína e de óleo de cravo.

TABELA 7 Período de permanência das tilápias anestesiadas com benzocaína e óleo de cravo nos diferentes estágios de recuperação e tempo total gasto para completa recuperação dos animais.

Concentração de benzocaína (mg/L)	Tempo de permanência (s)		Tempo total (s)
	Estágio 1	Estágio 2	
60	31,75 b	115,56	147,31
85	45,75 a	110,44	156,19
110	49,25 a	121,50	170,75
135	47,56 a	111,56	159,13
160	45,56 a	125,13	170,69

Concentração óleo de cravo (mg/L)	Tempo de permanência (s)		Tempo total (s)
	Estágio 1	Estágio 2	
60	98,06 a	156,31	254,38
80	66,31 ab	124,56	190,88
100	79,87 ab	106,38	186,25
120	75,68 ab	108,88	184,56
140	55,68 b	130,13	185,81

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo testes SNK (P<0,05).

Tempo Total = Estágio 1 + Estágio 2.

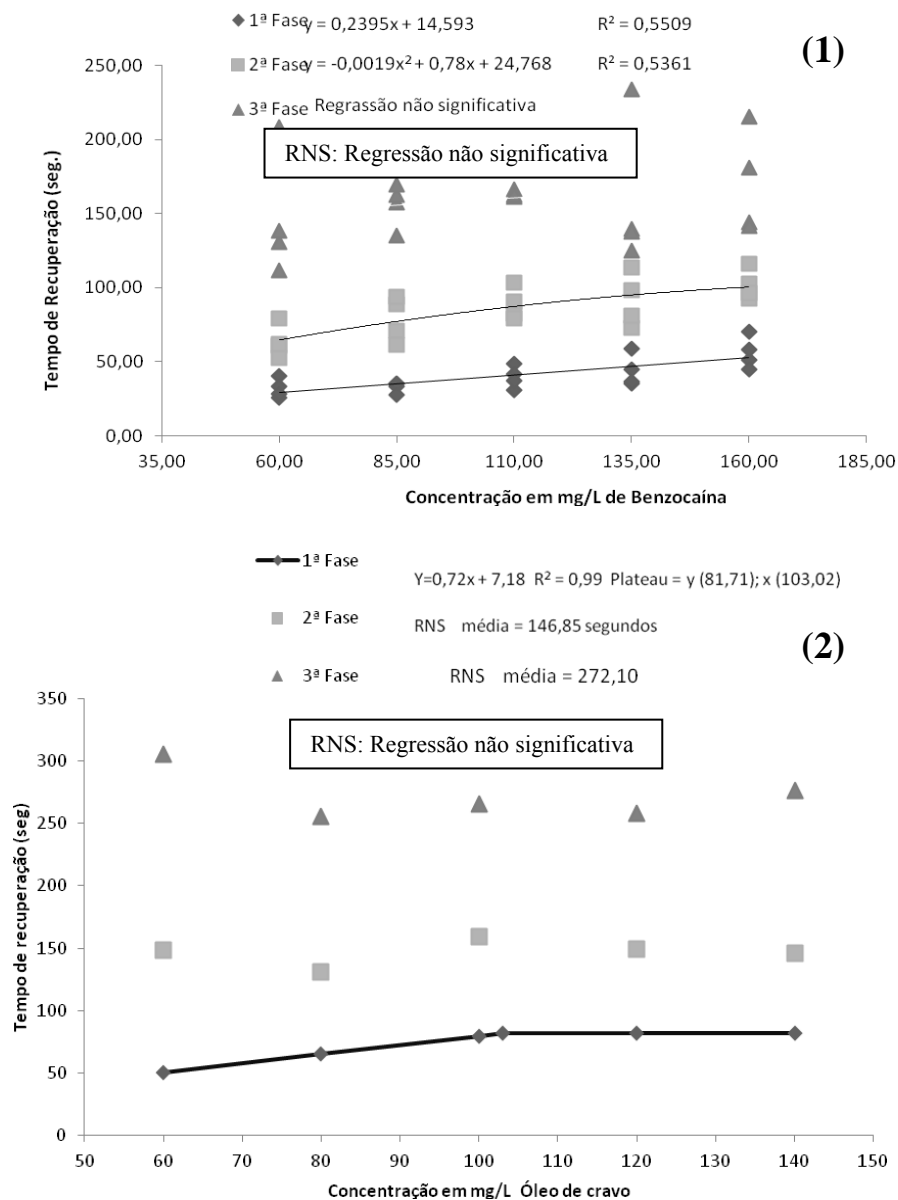


FIGURA 6 Comportamento de recuperação de juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*), em três fases de recuperação, submetidos a diferentes concentrações de benzocaína (1) e óleo de cravo (2).

Conforme observado, a concentração de ambos os anestésicos interfere no tempo de recuperação dos peixes após a anestesia. Esse efeito foi bem definido no estágio de recuperação 1, onde o menor tempo para apresentar os sinais característicos deste estágio, descritos por Ross e Ross (2000), foi alcançado com a utilização das menores doses anestésicas. Esse comportamento permaneceu nítido em todas as concentrações de benzocaína avaliadas. Porém, as doses de 120 e 140 mg/L de óleo de cravo não refletiram significativamente no tempo de recuperação dos animais neste estágio ($P>0,05$) (Figura 6).

A permanência no estágio de recuperação 1 compreende o período desde a apresentação dos primeiros sinais de restabelecimento do animal (leve recuperação do movimento opercular e dos movimentos natatórios), até o início da manifestação dos sinais característicos do segundo estágio (recuperação do equilíbrio e leve reação a estímulos externos).

As tilápias anestesiadas com 60 mg/L de benzocaína passaram mais rapidamente pelo estágio de recuperação 1, quando comparadas àquelas submetidas às demais concentrações deste anestésico (85, 110, 135 e 160 mg/L). Estas concentrações mais elevadas (85, 110, 135 e 160 mg/L) provocaram uma demora no retorno da condição de anestesia neste período, sendo estatisticamente diferentes da dose mais baixa (60 mg/L) ($P<0,05$), com tempos de 45,75; 49,25; 47,56 e 45,56 segundos, respectivamente (Tabela 7).

As concentrações de óleo de cravo avaliadas neste experimento influenciaram o retorno dos peixes nesta etapa ($P<0,05$). A concentração de 60 mg/L provocou tempo de recuperação dos animais maior, quando comparada com a concentração de 140 mg/L. As demais concentrações (80, 100 e 120 mg/L) não foram estatisticamente diferentes da menor e maior dose estudada (60 e 140 mg/L, respectivamente) demonstrando uma recuperação intermediária (Tabela 7).

Na segunda fase de recuperação, com a utilização do anestésico benzocaína, foi possível observar que o período de recuperação das tilápias elevava-se à medida que as concentrações aumentavam (60, 85, 110, 135, 160 mg/L). Não se observou tal comportamento dos animais durante a utilização do óleo de cravo (Figura 6).

As concentrações de ambos os anestésicos não influenciaram o período de permanência das tilápias no estágio de recuperação 2 ($P>0,05$) (Tabela 7).

Durante a terceira fase, o tempo de recuperação dos peixes não foi afetado pela concentração anestésica utilizada para benzocaína, ou para o óleo de cravo (Figura 6). Esse efeito também foi observado quando avaliamos o tempo total gasto pelos animais ao retornarem da condição de anestesia, igualmente sem diferença significativa ($P>0,05$) (Tabela 7). Okamura et al. (2008) também não registraram diferença neste estágio de recuperação.

Após análise dos resultados apresentados, podemos notar que houve diferenças evidentes entre as concentrações de um dos anestésicos e entre os anestésicos estudados. Este efeito também foi relatado por diversos pesquisadores (KING et al., 2005; OKAMURA et al., 2008).

A Tabela 8 mostra a análise comparativa entre os anestésicos e as concentrações que melhor determinaram o comportamento das tilápias neste trabalho.

TABELA 8 Diferença entre benzocaína e óleo de cravo no período de permanência em indução total, em anestesia e recuperação total.

Anestésicos (mg/L)		Período de permanência (s)		
Benzocaína	Óleo de cravo	Indução total	Anestesia	Recuperação total
-	100	80,12 a	79,63 a	186,25
-	120	54,00 b	73,31 a	184,56
135	-	30,75 c	43,94 b	159,13
160	-	32,06 c	56,31 b	170,69

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo testes SNK ($P < 0,05$).

Ao analisar os dados apresentados na Tabela 8, verificamos que as concentrações de 135 e de 160 mg/L de benzocaína induziram os animais à anestesia em 30,75 e 32,06 segundos, respectivamente, não demonstrando diferenças significativas nos tempos de permanência em indução total das tilápias ($P > 0,05$). Entretanto, estas concentrações foram mais eficientes na indução total, quando comparadas às doses de 100 e 120 mg/L de óleo de cravo, que induziram os peixes em 80,12 e 54,00 segundos, respectivamente, com diferenças estatísticas entre si ($P < 0,05$), sendo que 120 mg/L de óleo de cravo foram mais eficientes nesta etapa do que 100 mg/L do mesmo anestésico.

Quanto à ação de ambas as substâncias anestésicas ($P > 0,05$), não houve diferenças significativas no período de recuperação total dos juvenis de tilápia avaliadas neste estudo.

De maneira geral, comparada ao óleo de cravo, a benzocaína induz os animais à condição de anestesia mais rapidamente. Porém, o tempo de permanência dos animais em anestesia profunda é menor. Por outro lado, apesar de determinar um tempo maior para a indução anestésica, o óleo de cravo mantém os animais em anestesia total por mais tempo.

Mediante os dados obtidos neste trabalho, concluímos que não existe uma concentração e/ou um anestésico ideal para todos os manejos empregados na piscicultura. Assim, no atual estágio da pesquisa e da prática, pode-se dizer que os objetivos pretendidos definem a droga mais adequada a ser utilizada, bem como a sua concentração.

5 CONCLUSÕES

A benzocaína e o óleo de cravo foram eficientes na anestesia de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para o manejo de rotina na piscicultura, onde geralmente se deseja uma rápida atuação do anestésico, evitando o agravamento do estresse nos animais, bem como um efeito sedativo mais prolongado, a concentração de 135 mg/L de benzocaína ou de 120 mg/L de óleo de cravo pode ser utilizada em procedimentos anestésicos em juvenis de tilápia, tendo em vista as condições experimentais verificadas neste trabalho

REFERÊNCIAS

ACERETE, L. et al. 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, Aug. 2004.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. 2000 report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, n. 5, p. 669-696, Mar. 2001.

BURKA, J. F. et al. Drugs in salmonid aquaculture. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 333-349, Oct. 1997.

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

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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v35n1/v35n1a10.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. 4th ed. Rockville, 2011. 468 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2011.

FRISCH, A. J.; ANDERSON, T. A. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 23-34, July 2000.

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: Molecular Integrative and Physiology**, New York, v. 124, n. 3, p. 329-334, Nov. 1999.

GREEN, C. J. **Animal anaesthesia**. London: Laboratory Animal, 1979. v. 8, 300 p.

HANAWA, M. et al. Effects of cyanide exposure on *Dascyllus aruanus*, a tropical marine fish species: lethality, anaesthesia and physiological effects. **Aquarium Sciences and Conservation**, London, v. 2, n. 1, p. 21-34, mar. 1998.

HEAVNER, J. E. Animal models and methods in anaesthesia research. In: GAY, W. I. (Ed.). **Methods in animal experimentation**. New York: Academic Press, 1981. v. 6, p. 115-130.

HER MAJESTY'S STATIONERY OFFICE. **Code of practice for the humane killing of animals under schedule 1 to the animals (Scientific procedures) Act 1986**. London, 1997. p. 3.

HILL, J. V.; DAVISON, W.; FORSTER, M. E. The effects of fish anaesthetics (MS222, 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.

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, Sept. 2004.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. 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.

HOWE, G. E.; BILLS, T. D.; MARKING, L. L. Removal of benzocaine from water by filtration with activated carbon. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v. 52, n. 1, p. 32-35, 1990.

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.

KIESSLING, A. et al. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, ms-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated atlantic salmon (*salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, n. 3/4, p. 301-308, Jan. 2009.

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.

MASSEE, K. C. et al. The effectiveness of tricaine, quinaldine sulfate and metomidate as anesthetics for larval fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 134, n. 3/4, p. 351-359, July 1995.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas: texto e atlas colorido**. 5. ed. ampl. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 20, 571 p.

MCFARLAND, W. N. A study of the effects of anaesthetics on the behaviour and physiology of fishes. **Publications of the Institute Marine Science**, Austin, v. 6, p. 22-55, 1959.

MUNDAY, P. L.; WILSON, S. K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboiensis*, a coral reef fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 51, n. 5, p. 931-938, Nov. 1997.

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.

MYSZKOWSKI, B. L.; KAMINSKI, R.; WOLNICKI, J. Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 142-145, June 2003.

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 2008.

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.

PALIC, D. et al. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 254, n. 1/4, p. 675-685, Apr. 2006.

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

ROSS, L. G.; ROSS, B. Book reviews: anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. **Journal of Fish Biology**, London, v. 56, n. 6, p. 1562-1565, June 2000.

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: Molecular Integrative and Physiology**, New York, v. 140, n. 3, p. 289-298, Mar. 2005.

RUANE, N. M.; CARBALLO, E. C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 777-784, Aug. 2002.

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.

SHAVIT, Y. et al. Effects of surgical stress on brain prostaglandin E2 production and on the pituitary–adrenal axis: Attenuation by preemptive analgesia and by central amygdala lesion. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1045, n. 1, p. 10-17, June 2005.

SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, n. 1/4, p. 177-185, Mar. 2003.

SOTO, C. G.; BURHANUDDIN, C. G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 136, n. 1/2, p. 149-152, Nov. 1995.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effects of temperature on the elimination of benzocaine and acetylated benzocaine residues from the edible fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 5, p. 387-392, May 2000.

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.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **Sistema para análise estatística e genética – SAGE**: manual de uso. Viçosa, MG: FUNARBE, 1997. 150 p.

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.

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.