

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ANTONIO GLAYDSON LIMA MOREIRA

**ÓLEO DE CRAVO COMO AGENTE ANESTÉSICO NO TRANSPORTE DE
JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

FORTALEZA, CEARÁ

2012

ANTONIO GLAYDSON LIMA MOREIRA

ÓLEO DE CRAVO COMO AGENTE ANESTÉSICO NO TRANSPORTE DE JUVENIS DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau em Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias

FORTALEZA, CEARÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M836o Moreira, Antonio Glaydson Lima.
 Óleo de cravo como agente anestésico no transporte de juvenis de tilápia do
 nilo (*Oreochromis niloticus*) / Antonio Glaydson Lima Moreira. – 2012.
 90 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de
 Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-
 Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2012.
 Área de Concentração: Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros.
 Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.
1. Tilápia (Peixe). 2. Stress (Fisiologia). I. Título.

CDD 639.2

ANTONIO GLAYDSON LIMA MOREIRA

ÓLEO DE CRAVO COMO AGENTE ANESTÉSICO NO TRANSPORTE DE JUVENIS DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau em Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: __/ __/ ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Glácio Souza Araújo

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

Aos meus pais,
por tudo que vocês significam pra mim.
Amo vocês incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Ao Mestre dos mestres, pelo dom da vida e por mais esta benção alcançada.

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional em cada momento desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pela orientação e ajuda no momento que mais precisei.

Aos professores participantes da Banca Examinadora, Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto e Prof. Dr. Glácio Souza Araújo, pelas valiosas sugestões e colaborações.

Ao Prof. Dr. José Milton Barbosa da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pelos sábios pareceres para melhorar a redação do manuscrito.

Aos meus colegas da Estação de Piscicultura Professor Raimundo Saraiva da Costa (DEP/UFC) e do Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA), principalmente aos amigos Fellipy Augusto Holanda Chaves, Erivânia Gomes Teixeira e Plácido Soares de Moura.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma me ajudaram a cumprir mais esta etapa na minha vida.

“A cultura forma sábios; a educação, homens”

(Louis Bonald)

RESUMO

O transporte de peixes vivos é um estímulo adverso à homeostase dos peixes. É uma prática traumática para os animais, pois envolve a captura, a manipulação, o armazenamento dos indivíduos e o deslocamento, até a liberação, o que sugere a necessidade de um procedimento para minimizar estes estressores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo de cravo nas respostas metabólicas e iônicas de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos à simulação do transporte em sacos plásticos, em diferentes densidades. Foram realizados dois experimentos: no primeiro foram avaliadas quatro concentrações de óleo de cravo (quatro repetições, cada): 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹, para examinar o comportamento dos peixes durante e após a simulação do transporte, a sobrevivência e a qualidade da água. Foram utilizados vinte peixes por saco de transporte (50 g L⁻¹); No segundo experimento, se utilizou apenas a melhor concentração do anestésico, observado no primeiro experimento. Os peixes foram estocados em sacos plásticos nas densidades de 16, 28 e 40 peixes por saco, equivalente a 140, 245 e 350 g L⁻¹, respectivamente. Após nova simulação de transporte, foram avaliados os níveis de glicose sanguínea, lactato, íons cloreto, magnésio e cálcio. No primeiro experimento, as duas menores concentrações foram ineficientes para anestésiar os animais. A concentração de 20 mg L⁻¹ amenizou a excreção de compostos nitrogenados, porém resultou num elevado índice de mortalidade, enquanto a concentração de 15 mg L⁻¹ apresentou os resultados mais satisfatórios. No segundo experimento, o anestésico não foi capaz de minimizar a elevação dos níveis de glicose e lactato, independente da densidade utilizada. Quanto as variáveis iônicas, com exceção do Mg⁺², a utilização do óleo de cravo conseguiu manter os níveis dos íons Cl⁻ e Ca⁺². O uso do óleo de cravo apresentou pouco efeito preventivo ao estresse causado pela simulação do transporte, podendo ter atuado inclusive como agente estressor adicional.

Palavras-chave: Anestesia, estresse, fisiologia, peixes.

ABSTRACT

Transport of live fish is a harmful stimulus to organisms homeostasis. This practice is traumatic for the animals, because it's involves the capture, handling and storage and the displacement of individuals, until the release. This suggests the need for a procedure to reduce these stressors. The objective of this study was to evaluate the effect of clove oil in ionic and metabolic responses of juvenile Nile tilapia, undergoing transport simulation in plastic bags, in different densities. Two experiments were conducted: the first evaluated four concentrations of clove oil (four replicates each): 5, 10, 15 and 20 mg L⁻¹, to examine fishes behavior during and after the transport simulation, survival and water quality. Twenty fishes were used per carry bag (50 g L⁻¹): In the second experiment, only the best anesthetic concentration observed in the first experiment was used. Fishes were stored in plastic bags at densities of 16, 28 and 40 fish per bag, equivalent to 140, 245 and 350 g L⁻¹, respectively. After a new transport simulation, the levels of blood glucose, lactate, chloride ions, magnesium and calcium were evaluated. In the first experiment, the two lower concentrations were ineffective to anesthetize the animals. The concentration of 20 mg L⁻¹ attenuated the excretion of nitrogenous compounds, but resulted in a high mortality rate, while the concentration of 15 mg L⁻¹ showed the most satisfactory results. In the second experiment, the anesthetic was not able to minimize the increasing levels of glucose, lactate, independent of the density used. About the ionic variables, the use of clove oil was able to maintain levels of Cl⁻ and Ca⁺², except for Mg⁺². The use of clove oil showed little preventive effect on stress caused by transport simulation, and may even have acted as an additional stressor agent.

Keywords: Anaesthesia, stress, physiology, fishes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Diagrama generalizado dos elementos neuroendócrinos da resposta ao estresse em peixes teleósteos.....	20
Figura 2 -	Exemplares de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos sob o efeito de diferentes concentrações de óleo de cravo.....	30
Figura 3 -	Efeito de diferentes concentrações de óleo de cravo na frequência opercular (batidas min^{-1}) de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos.....	36
Figura 4 -	Efeito de diferentes concentrações de óleo de cravo na taxa de batimento da nadadeira peitoral (batidas min^{-1}) de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos.....	40
Figura 5 -	Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) na glicose plasmática de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.....	44
Figura 6 -	Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no lactato de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.....	46
Figura 7 -	Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no cloreto plasmático de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.....	47
Figura 8 -	Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no magnésio plasmático de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.....	48
Figura 9 -	Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no cálcio plasmático de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.....	49
Figura 10 -	Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) na sobrevivência de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estágios de anestesia em peixes.....	24
Tabela 2 - Estágios de recuperação anestésica em peixes.....	25
Tabela 3 - Parâmetros físicos e químicos da água após quatro horas de simulação de transporte em sacos plásticos sob influência de diferentes concentrações de óleo de cravo.....	28
Tabela 4 - Eventos comportamentais de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos sob influência de diferentes concentrações de óleo de cravo.....	31
Tabela 5 - Frequência de batimento opercular (batimentos minuto ⁻¹) durante a simulação de transporte de juvenis de tilápia do Nilo em sacos plásticos contendo diferentes concentrações de óleo de cravo.....	33
Tabela 6 - Frequência de batimento da nadadeira peitoral (batimentos minuto ⁻¹) durante a simulação de transporte de juvenis de tilápia do Nilo em sacos plásticos contendo diferentes concentrações de óleo de cravo.....	38
Tabela 7 - Parâmetros físicos e químicos da água após quatro horas de simulação de transporte em sacos plásticos sob influência de diferentes densidades.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Desvio padrão
ANOVA	Análise de variância
bpm	Batidas por minuto
°C	Graus Celsius
CEBIAQUA	Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura
DEP	Departamento de Engenharia de Pesca
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
g L ⁻¹	Gramma por litro
NaCl	Cloreto de sódio
mg	Miligramma
mg dL ⁻¹	Miligramma por decilitro
mg L ⁻¹	Miligramma por litro
mEq L ⁻¹	Miliequivalente por litro
MS222	Tricaína metanosulfanato
μS cm ⁻¹	Microsiemens por centímetro
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITARATURA.....	16
2.1 Transporte de peixes vivos.....	16
2.2 Estresse em peixes.....	17
2.3 Respostas fisiológicas ao estresse.....	19
2.4 Óleo de cravo.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material biológico e aclimação.....	23
3.2 Experimento I: Determinação da concentração ideal de óleo de cravo para o transporte.....	23
3.3 Experimento II: Efeito de diferentes densidades no transporte sob indução anestésica.....	25
3.4 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Experimento I: Determinação da concentração ideal de eugenol para o transporte.....	28
4.2 Experimento II: Efeito de diferentes densidades no transporte sob indução anestésica.....	42
5 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de organismos aquáticos, conhecido como aquicultura, é um dos setores da produção animal que mais se expandiu no mundo, particularmente a piscicultura (cultivo de peixes), sendo de suma importância econômica em vários continentes (CONTE, 2004). O Brasil é um dos países com maior potencial para a piscicultura, principalmente a dulcícola. Neste contexto, se destaca o cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que é a espécie mais cultivada no nosso país, assim como em diversas partes do mundo (DERIGGI *et al.*, 2006).

A tilápia do Nilo é uma espécie de alto interesse comercial, pois apresenta uma carne de excelente sabor e com boa aceitação no mercado consumidor (HAYASHI *et al.*, 1999). Seu cultivo é realizado principalmente no sistema intensivo, caracterizado pelas altas densidades de estocagem. Além desta característica, práticas realizadas rotineiramente, como biometria, captura e transporte, expõem os peixes a diversos fatores estressantes (URBINATI *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2008), desencadeando a diminuição da alimentação e do crescimento e o aumento da mortalidade.

Metodologias para diminuir a interferência de estressores nas funções vitais e fisiológicas dos peixes são importantes durante o manejo. Nos últimos anos, os anestésicos surgiram como uma ferramenta importante na aquicultura no intuito de diminuir o nível de estresse e a mortalidade dos peixes (ROUBACH *et al.*, 2005; VELISEK *et al.*, 2005; MAMANGKEY *et al.*, 2009).

A tilápia é um peixe que possui espinhos ósseos nas nadadeiras, que freqüentemente provocam ferimentos nos manipuladores durante o manejo. Assim, o uso de anestésicos em tilápias é necessário para reduzir o estresse e aumentar a segurança do trabalho para os mesmos (VIDAL *et al.*, 2008).

O conhecimento acerca do bem estar dos peixes vem modelando normas de boas práticas, linhas de orientação e legislação sobre como os animais devem ser manipulados em cativeiro (VOLPATO, 2007). Diante do desenvolvimento da tilapicultura em nosso país, principalmente no estado do Ceará, vários esforços têm sido realizados para intensificar e melhorar todas as etapas da cadeia produtiva desta espécie com objetivo de maximizar a

produção. Nesse processo, o transporte é uma das etapas mais importantes no manejo e na comercialização desses peixes (OLIVEIRA, 2009).

Os anestésicos sintéticos são bastante conhecidos e utilizados nas pisciculturas. Já foram descritos na literatura o uso do 2-fenoxietanol (BERNATZEDER *et al.*, 2008), a benzocaína (GONTIJO *et al.*, 2003), o metomidato (SMALL, 2003), a tricaína metanosulfanato ou MS222 (KANE *et al.*, 2004; PALIC *et al.*, 2006; ROMBOUGH, 2007), o bicarbonato de sódio (ALTUN *et al.*, 2009), o AQUI-S® (YOUNG, 2009), dentre outros. Entretanto, a maioria dos anestésicos sintéticos, em altas concentrações, são altamente tóxicos para os peixes, além de apresentarem custo elevado (ROUBACH *et al.*, 2001; SHARP *et al.*, 2004).

Devido às desvantagens apresentadas pelos anestésicos sintéticos, estudos utilizando óleos naturais essenciais de várias plantas com ação anestésica vêm sendo realizados nos últimos anos. Estes anestésicos naturais possuem baixo custo e boa margem de segurança para os peixes (INOUE *et al.*, 2003), além de produzirem efeito antiinflamatório, cicatrizante, analgésico e bactericida (WOODY *et al.*, 2002). Vários estudos utilizando o óleo de cravo em peixes (PIRHONEN; SCHRECH, 2003; COTTER; RODNICK, 2006; GHAZILOU, *et al.*, 2010) e até em invertebrados (FRISCH *et al.*, 2007; SEOL *et al.*, 2007; AKBARI *et al.*, 2010) já foram descritos. Outro anestésico natural que vem sendo pesquisado, embora não tão difundido quanto o óleo de cravo, é o mentol (GONÇALVES *et al.*, 2008; SIMÕES; GOMES, 2009).

No Brasil, não existem leis que regulamentem o uso de anestésicos para peixes (FAÇANHA; GOMES, 2005), então se procura seguir as recomendações da Food and Drug Administration (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos da América que cita o MS222, um dos anestésicos sintéticos mais utilizados em peixes (MATSCHE, 2011), como único anestésico químico aprovado (PALMER; MENSINGER, 2004; MEINERTZ *et al.*, 2006; VELISEK *et al.*, 2011). No entanto, o mesmo não é produzido no Brasil e seu valor comercial pode ser até dez vezes maior que seu similar, a benzocaína (GOMES *et al.*, 2001).

Desta forma, justifica-se a busca por alternativas seguras para procedimentos de anestesia de peixes no Brasil, o que servirá como subsídio para as autoridades responsáveis por este tipo de regulamentação. Para tanto, se faz necessário mais pesquisas, pois a eficácia dos agentes anestésicos varia dentre e entre as espécies (VIDAL *et al.*, 2007; ZAHL *et al.*,

2009), além do mais a concentração ideal de cada anestésico também dependerá do tamanho do peixe (MOREIRA *et al.*, 2010).

O processo de anestesia em peixes deve ser realizado com eficiência biológica e econômica. Do ponto de vista biológico, a anestesia não pode causar danos ao crescimento, nem à reprodução dos mesmos. Enquanto do ponto de vista econômico, não se deve utilizar doses acima das necessárias, minimizando desperdício do produto e morte dos animais por “overdose” (ROUBACH; GOMES, 2001).

A anestesia é um estado fisiológico caracterizado principalmente pela amnésia, analgesia, relaxamento do músculo e perda da consciência. Estas características podem ser produzidas separadamente, mas somente quando combinadas é possível alcançar a anestesia geral (HUMPHREY *et al.*, 2002). O critério para determinar a eficácia dos anestésicos em peixes é baseado nas respostas comportamentais (TSANTILAS *et al.*, 2006). Para Park *et al.* (2009a), a concentração ótima de um anestésico deve minimizar os impactos negativos do manejo, reduzir o estresse nos peixes, produzir anestesia em período menor ou igual a três minutos e permitir uma recuperação num prazo máximo de dez minutos.

Entretanto, essas premissas não valem para o transporte de peixes, uma vez que os animais passam muitas horas imersos na água contendo o anestésico. Uma exposição por um tempo muito prolongado, mesmo em baixas concentrações, pode ser prejudicial aos mesmos, aumentando o estresse (FENG *et al.*, 2011) e chegando por muitas vezes a matá-los. De acordo com Park *et al.* (2008), concentrações muito elevadas de anestésico podem ser mais estressantes que o não uso do fármaco, causando um maior consumo de oxigênio.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo de cravo nas respostas metabólicas e iônicas de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos à simulação do transporte em sacos plásticos, em diferentes densidades, a fim de verificar a eficiência do produto como anestésico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transporte de peixes vivos

O transporte de peixes vivos é um procedimento comum na piscicultura (EMATA, 2000). No entanto, é certamente um dos principais problemas que afeta a homeostase dos peixes nas condições de criação em cativeiro (INOUE *et al.*, 2005). O transporte de peixes é uma prática muito traumática, pois além do deslocamento em si, também envolve a captura nos tanques de reprodução, a manipulação e o armazenamento dos indivíduos até a liberação. De acordo com Gomes *et al* (2003b), são várias as finalidades do transporte: como aquisição de peixes adultos para pesque-pagues, alevinos ou reprodutores para criatórios e peixes destinados ao comércio de peixe vivo, em feiras e estabelecimentos comerciais específicos.

A atividade física associada ao estresse no transporte pode causar impactos negativos na qualidade da carne em muitas espécies de animais, incluindo os peixes (BOSWORTH *et al.*, 2007). Estes impactos são geralmente atribuídos ao aumento do metabolismo anaeróbio, rápido declínio do pH e aceleração da desnaturação ou degradação das proteínas do músculo (RATHGEBER *et al.*, 1999). Estas mudanças podem resultar em uma coloração indesejável e amolecimento da carne, redução na capacidade de retenção de água e diminuição da vida de prateleira (BOSWORTH *et al.*, 2007).

O sucesso do transporte é dependente de alguns fatores como o tempo em que ele ocorre, a qualidade da água, o tamanho do peixe, a densidade estocada, as condições fisiológicas do animal e o período de depuração antes do transporte. O estresse causado pelo transporte é classificado como sendo agudo e afeta seriamente o estado fisiológico dos peixes, causando um incremento nos níveis de cortisol plasmático dos animais, decorrente da síntese de catecolaminas e corticosteróides (BARTON; IWAMA, 1991), aumento da frequência cardíaca e mobilização das reservas energéticas (CUESTA *et al.*, 2003). Os efeitos negativos do estresse dependem da severidade e duração do agente estressor.

Um dos principais critérios avaliados pelos compradores de peixe vivo é a sobrevivência, devendo o piscicultor encontrar formas que viabilizem o deslocamento dos animais, a fim de que, os animais cheguem ao destino em boas condições fisiológicas. No Brasil, muitos piscicultores realizam o transporte de peixe vivo em sacos plásticos, sendo esta prática condicionada ao fato da limitação do suprimento de oxigênio dissolvido e consequente

aumento na concentração de metabólitos tóxicos, como a amônia (GONÇALVES *et al.*, 2010). Desta forma, algumas drogas, dentre elas os anestésicos, são utilizadas primariamente no intuito de diminuir o metabolismo dos animais, resultando em um menor consumo de oxigênio e menor produção de compostos tóxicos (FINSTAD *et al.*, 2003).

O transporte de peixes vivos pode ocorrer de diferentes formas e durações bem distintas, dependendo da finalidade. Esta prática é responsável muitas vezes por perdas relevantes, trazendo prejuízo aos piscicultores, aumentando os custos de produção (GOMES *et al.*, 2006a). O transporte inadequado pode resultar em 100% de mortalidade devido às condições inapropriadas, sendo importante também acompanhar a sobrevivência pós-transporte (NOMURA *et al.*, 2008).

A densidade estocada nos sacos de transporte é outro fator limitante, haja vista que a utilização de densidades muito elevadas, resultará na maior produção de amônia e gás carbônico na água, como também acarretará o aumento de choques mecânicos entre os indivíduos, além de um consumo mais elevado de oxigênio dissolvido. Segundo Colburn *et al.* (2010), o reduzido volume de água utilizado nos sacos de transporte e as altas densidades estocadas, resultam em situações estressantes para os peixes.

Outra prática bastante comum para reduzir o estresse dos peixes é a adição de cloreto de sódio (NaCl) na água durante o transporte. No transporte de matrinxãs, *Brycon cephalus*, a ligeira elevação de sal na água tornou os peixes menos hipertônicos em relação ao meio, diminuindo o transporte ativo dos íons e, conseqüentemente, melhorando o conforto osmótico dos peixes (CARNEIRO; URBINATI, 2001). No entanto, o uso de sal no transporte não foi eficaz para o pirarucu, *Arapaima gigas*, e causou distúrbios osmorregulatórios nos animais (GOMES *et al.*, 2006b).

2.2 Estresse em peixes

Peixes cultivados são submetidos constantemente a diferentes procedimentos de manejo, estressando os animais e alterando a homeostase, que pode levar a inibição do crescimento e do processo reprodutivo, resultando em prejuízo para o produtor. Com isso, pesquisas acerca do aprimoramento no manejo de peixes têm sido muito importantes, pois a

inevitável manipulação dos animais causa uma série de reações fisiológicas adversas. Além disso, a intensidade das alterações e o tempo para o animal retornar às condições fisiológicas basais são indicadores bastante úteis na qualidade da manipulação dos peixes, pois só a partir da completa recuperação, eles estarão novamente aptos a alimentar, crescer e reproduzir (INOUE, 2005).

O estresse pode ser definido como uma perturbação intrínseca ou extrínseca a um determinado organismo, causando um desequilíbrio na homeostase ou no seu equilíbrio fisiológico dinâmico (PICKERING, 1981; BARTON, 2002). A ação dos agentes estressores pode ameaçar e/ou perturbar o equilíbrio homeostático, produzindo mudanças comportamentais e fisiológicas nos animais, obrigando-os a se adaptem às novas condições (IVERSEN; ELIASSEN, 2009).

Em resposta aos agentes estressores, os peixes possuem a capacidade de mobilizar suas reservas energéticas no intuito de atenuar ou vencer as situações de ameaça, respondendo ao estresse de forma proporcional à gravidade e duração do agente estressor, de acordo com sua variabilidade genética (TANCK *et al.*, 2002).

O estresse pode ser classificado como agudo ou crônico. O estresse agudo ocorre quando há algum erro momentâneo no manejo causado por uma manipulação abrupta ou também quando há uma modificação no meio ambiente (BARCELLOS *et al.*, 1999a), enquanto o estresse crônico ocorre quando os animais permanecem por um longo período em condições inadequadas, por exemplo, em altas densidades de estocagem (BARCELLOS *et al.*, 1999b) e em má qualidade da água (WENDELAAR BONGA, 1997).

De acordo com Lefrançois *et al.* (2001), o estresse provoca modificações na agressividade, gerando uma maior exigência metabólica, aumentando o consumo de oxigênio e produzindo mais metabólitos. Ademais, afeta a atividade dos leucócitos, facilitando a infecção por fungos e bactérias, podendo causar mortalidade (DURVILLE; COLLET, 2001).

Segundo Small (2004), o estresse também tem a capacidade de inibir o desempenho reprodutivo de peixes. Lima *et al.* (2006) corroboram esta afirmativa em seus estudos ao concluírem que o estresse de manejo pode adiantar ou atrasar o período normal de reprodução de algumas espécies como a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, enquanto que na tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, dependendo do estágio de maturação gonadal, o estresse pode causar completamente a parada de sua reprodução.

2.3 Respostas fisiológicas ao estresse

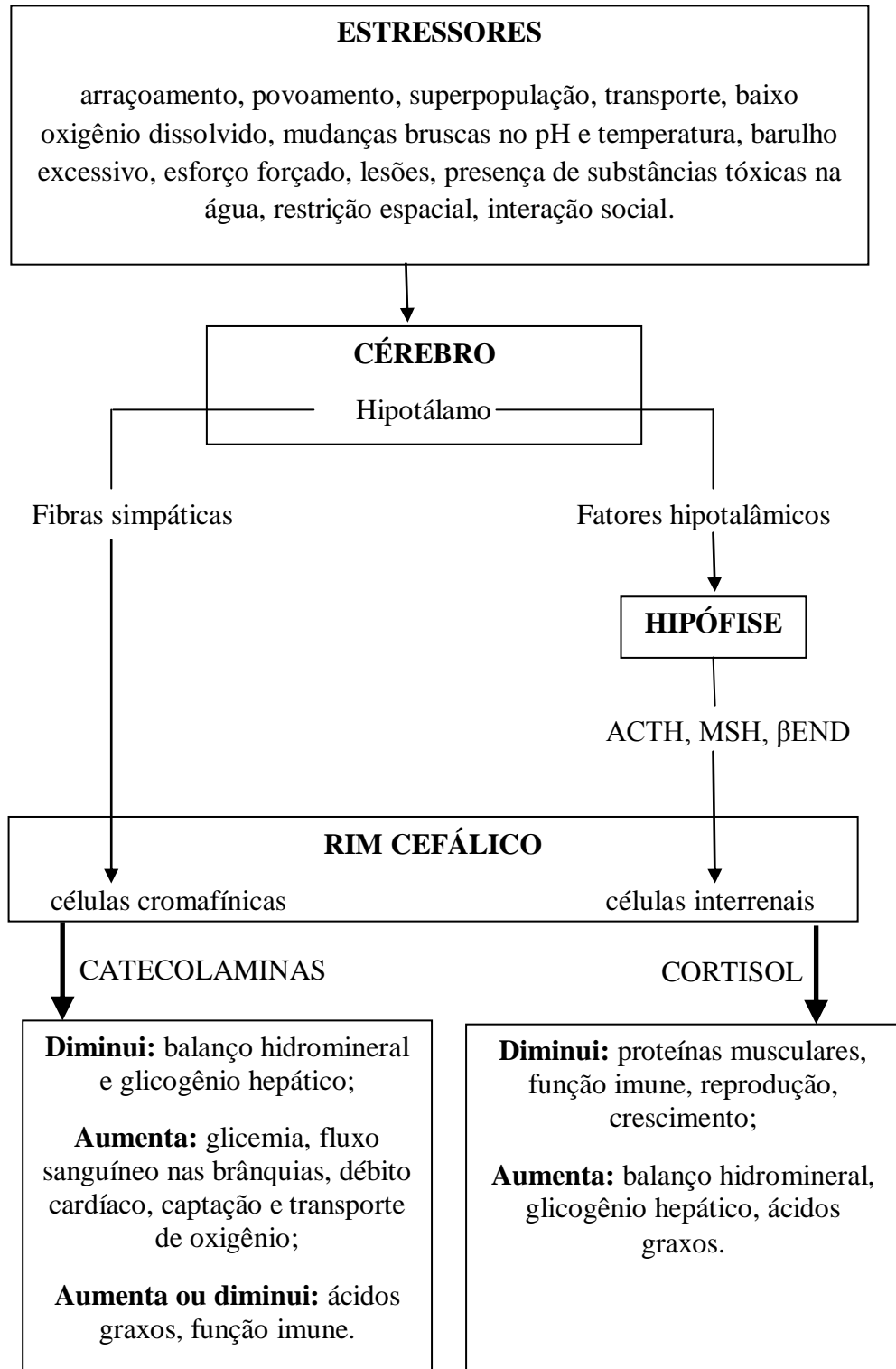
As respostas fisiológicas expressas pelos peixes devido aos estímulos adversos ocasionados por agentes estressores podem ser primárias, secundárias e terciárias (BILLER *et al.*, 2008).

As respostas primárias são as hormonais (BRANDÃO *et al.*, 2006), referem-se ao reconhecimento do agente estressor, através do sistema nervoso central (SNC), ativando o sistema cérebro-pituitária-inter-renal (CPI) e as células simpáticas de cromafina (CSC) do cérebro (BARBOSA, 2007). Logo que o estímulo adverso é percebido, ocorre a liberação de hormônios, catecolaminas e corticosteróides na corrente sanguínea (MOMMSEN *et al.*, 1999), caracterizado pelo aumento da concentração de cortisol no sangue, evidenciando mudança na homeostase (ADAMANTE *et al.*, 2008). As catecolaminas induzem uma rápida elevação de glicose no sangue, através da glicogenólise (ROTHWELL *et al.*, 2005), enquanto o cortisol é envolvido, possivelmente com outros hormônios, no aumento de ácidos graxos no sangue (BARTON, 2002).

As respostas secundárias são as mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos (BRANDÃO *et al.*, 2006), caracterizados pelo aumento da glicose plasmática e por distúrbios na osmorregulação (DAVIS; GRIFFIN, 2004). Quando os peixes estão submetidos a algum agente estressor, necessitam de energia para se adaptarem às novas condições. Desta forma, eles fazem uso de suas reservas hepáticas de glicogênio através da glicogenólise, disponibilizando esta energia necessária (ACERETE, *et al.*, 2004; IWAMA *et al.*, 2004). Assim sendo, o nível de glicose é utilizado para caracterizar a resposta secundária. Além da elevação de glicose na corrente sanguínea, o aumento da concentração de lactato decorrente do metabolismo anaeróbico, também é uma resposta secundária ao estresse (LI *et al.*, 2009).

As respostas terciárias são caracterizadas pelo comprometimento do crescimento, mudanças no comportamento e aumento da susceptibilidade a doenças (GOMES *et al.*, 2003a). Estas respostas geralmente independem do agente estressor, mas o aspecto quantitativo desta resposta depende da intensidade e duração do estímulo (MEZEAUD *et al.*, 1977). É neste estágio de estresse que as reais perdas na produção de peixes são observadas (INOUE, 2005). O esquema geral das mudanças fisiológicas ocasionadas pelo estresse em peixes está representado na figura 1.

Figura 1 - Diagrama generalizado dos elementos neuroendócrinos da resposta ao estresse em peixes teleósteos. ACTH – Hormônio Adreno Corticotrófico, MSH – Hormônio Melanócito Estimulante, β END – Endorfina.



Fonte: Adaptado de Wendelaar Bonga (1997).

2.4 Óleo de cravo

O óleo de cravo tem como principal componente o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), uma substância fenólica (MAZZAFERA, 2003) que pode ser obtida pela destilação do extrato de folhas, caules e raízes de vegetais das espécies *Eugenia caryophyllata* (BOYER et al., 2009) e *E. aromatica* (CUNHA; ROSA, 2006). O uso do óleo de cravo para eutanásia em peixes é fato recente no setor da aquicultura (RIBAS, et al., 2007), porém seu uso como anestésico já é conhecido há vários anos.

O óleo de cravo é um anestésico economicamente viável, pois apresenta um baixo custo (WALSH; PEASE, 2002), tem uma boa margem de segurança para os peixes (PARK et al., 2008) não é tóxico para seres humanos (KEENE et al., 1998; CHO; HEATH, 2000; IVERSEN et al., 2003), sendo considerado como um anestésico promissor para a indústria aquícola (HARPER, 2003). Além de anestésico, o óleo de cravo também age como agente antibacteriano e também é utilizado na odontologia (KEENE et al., 1998). Além dessas vantagens, o óleo de cravo é rapidamente metabolizado e excretado pelos peixes (WAGNER et al., 2002). Outras vantagens biológicas do óleo de cravo, como propriedades anti-inflamatórias e de proteção dos neurônios, foram descobertas recentemente (GUÉNETTE et al., 2007).

Outro benefício do óleo de cravo é a possibilidade de utilização de peixes que foram anestesiados para servir de alimento, uma vez que este fármaco não demanda um período longo de depuração, diferentemente da maioria dos fármacos utilizados como anestésico (KANG et al., 2005). De acordo com Kildea et al. (2004), a eliminação do eugenol em peixes pré expostos ocorre em torno de 12 horas. O MS22, por exemplo, demanda um período de depuração de 21 dias antes de serem destinados ao consumo nos Estados Unidos (PIRHONEN; SCHRECK, 2003), enquanto Reino Unido e Nova Zelândia, exigem dez dias (ROSS; ROSS, 2008).

Vários estudos vêm comparando os efeitos fisiológicos do óleo de cravo com os anestésicos convencionais, e de forma consistente, o óleo de cravo produz níveis semelhantes de distúrbios fisiológicos e minimiza as respostas dos agentes estressores de forma similar ao anestésico sintético MS222 (SLADKY et al., 2001; WAGNER et al., 2003). Todas as informações disponíveis sugerem que o uso deste anestésico natural é uma alternativa eficaz

para a sedação de peixes, apresentando várias vantagens sobre outros métodos de sedação, incluindo o baixo custo.

O isoeugenol (1-Hidroxi-2-metoxi-4-propenilbenzeno), um isômero do eugenol, é aprovado para anestésiar peixes em alguns países, como a Austrália, Chile e Nova Zelândia (SMALL, 2004; KIESSLING *et al.*, 2009). No entanto, seu uso nos Estados Unidos somente é liberado se usado como um suplemento alimentar (ROUBACH *et al.*, 2005), e sua utilização como anestésico em peixes está sendo estudada pelo FDA para uma futura aprovação (BOSWORTH *et al.*, 2007).

Curiosamente, na maioria dos estudos realizados até hoje, têm sido utilizadas altas concentrações de óleo de cravo, que resultam em uma rápida sedação profunda, perda de equilíbrio e perda de reflexo. Segundo Prince e Powell (2000), altas concentrações de anestésico para uma rápida sedação profunda são ideais para procedimentos invasivos, como cirurgias. No entanto, há casos que uma sedação leve é suficiente e mais desejável que uma sedação profunda para facilitar a movimentação dos peixes, como no caso do transporte.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico e aclimação

O trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA) do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP), Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), entre os meses de maio e setembro de 2011, quando foram realizados dois experimentos. Os peixes utilizados foram provenientes da Estação de Piscicultura Professor Raimundo Saraiva da Costa (DEP/UFC), onde foram mantidos em um tanque de alvenaria de 5.000 L, sendo alimentados com ração comercial (28%) duas vezes ao dia até a saciedade aparente, durante 30 dias até atingirem comprimento médio de $8,53 \pm 1,09$ cm e peso médio de $9,97 \pm 0,92$ g para a realização do experimento I.

Durante este período, a temperatura da água foi de $26,47 \pm 0,30^{\circ}\text{C}$, o oxigênio dissolvido em $6,15 \pm 1,12$ mg L⁻¹, o pH $7,35 \pm 0,22$, a condutividade elétrica $59,0 \pm 2,0$ μS e a concentração de amônia foi $0,03 \pm 0,01$ mg L⁻¹. A alimentação dos peixes foi cessada 24 horas antes do procedimento experimental. Ao final do primeiro experimento, os animais foram cultivados por mais 100 dias sob as mesmas condições já mencionadas até atingirem $12,47 \pm 0,21$ cm e $35,09 \pm 1,80$ g de comprimento e peso, respectivamente, para a realização do experimento II.

3.2 Experimento I: Determinação da concentração ideal de eugenol para o transporte

Após terem passado por um jejum de 24 horas, os peixes foram capturados aleatoriamente no tanque de alvenaria e colocados em sacos plásticos de 15 L de volume útil, com 4 L de água, contendo diferentes concentrações do anestésico. O eugenol, também conhecido como óleo de cravo e que, devido sua natureza hidrofóbica, foi diluído em álcool P.A na concentração 100 mg L⁻¹, em conformidade com a metodologia de Vidal *et al.* (2008).

O delineamento experimental foi totalmente ao acaso. O óleo de cravo (eugenol) foi utilizado nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ (4 repetições, cada uma), com a

estocagem de 20 peixes por saco (50 g L⁻¹). O comportamento dos peixes foi observado durante toda a simulação do transporte.

A simulação de transporte dos animais teve duração de quatro horas. Os peixes foram colocados nos sacos plásticos já com as doses do anestésico diluídas na água, os quais foram inflados com oxigênio puro e, em seguida, amarrados com ligas de borracha. Após este procedimento, os sacos foram dispostos lado a lado, e a cada 15 minutos, foram agitados manualmente simulando a movimentação durante o transporte. Durante todo o experimento, os peixes foram monitorados visualmente para avaliar o padrão comportamental, com base na descrição do comportamento dos peixes para os estágios de anestesia propostos por Ross e Ross (2008) (Tabela 1).

Tabela 1 – Estágios de anestesia em peixes.

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

Fonte: modificado de Ross e Ross (2008)

A cada 20 minutos foram monitoradas a frequência dos batimentos operculares e a taxa de batimento da nadadeira peitoral dos indivíduos (n=8 por tratamento), durante um período de 60 segundos. Além disso, também foi observada a quantidade de peixes que estavam descansando no fundo dos sacos de transporte.

Após a simulação do transporte, os peixes de cada tratamento foram transferidos para caixas de polietileno de 100 L providas de água limpa e aeração para determinação do tempo de recuperação do efeito anestésico, de acordo com critérios propostos por Hikasa et al. (1986) (Tabela 2). Além disso, durante 24 horas, foram observadas eventuais mudanças no comportamento dos indivíduos e a ocorrência de mortalidade.

Tabela 2 – Estágios de recuperação anestésica em peixes.

Estágio	Resposta comportamental
I	Reaparecimento dos movimentos operculares
II	Retorno parcial do equilíbrio e da capacidade de nado
III	Recuperação total do equilíbrio
IV	Nado e reação a estímulos externos ainda vacilantes
V	Total recuperação do equilíbrio e capacidade normal de nado

Fonte: Modificado de Hikasa *et al.* (1986)

A concentração ideal do anestésico foi a que resultou em uma melhor qualidade da água após a simulação do transporte, além de atribuir aos animais o melhor comportamento durante e após o experimento, bem como a menor taxa de mortalidade.

3.3 Experimento II: Efeito de diferentes densidades no transporte sob indução anestésica

Para a realização do segundo experimento, foi utilizada somente a concentração de óleo de cravo que obteve melhor resultado determinada no experimento I. Os peixes foram transferidos para três caixas de polietileno (caixas de depuração) com volume útil de 100 L, sendo estocados nas densidades 4, 7 e 10 peixes L⁻¹, equivalente a 140, 245 e 350 g L⁻¹, respectivamente, onde foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade aparente e permaneceram, durante uma semana, para aclimação, sendo a alimentação cessada 24 horas antes do procedimento experimental. Cada caixa continha um sistema de aeração contínuo, composto por um compressor de ar e pedra porosa. Para cada densidade foram utilizadas 4 repetições durante a simulação do transporte.

Antes da simulação do transporte, cinco peixes do tanque de aclimatação foram coletados aleatoriamente para constituir o grupo Controle. Em seguida, os peixes foram transferidos, na mesma densidade que se encontravam nas caixas de depuração, para sacos plásticos de 15 L de volume útil, contendo 4 L de água mais a solução anestésica. Os demais animais restantes em cada caixa foram descartados e os sacos foram inflados com oxigênio puro e amarrados com ligas de borracha, sendo dispostos lado a lado. Os animais foram submetidos durante quatro horas ao estresse ocasionado pela simulação do transporte. Após a simulação, os peixes de cada densidade foram transferidos para as mesmas caixas que foram utilizadas antes do transporte para o monitoramento da recuperação e avaliação dos parâmetros fisiológicos.

Para avaliar as concentrações de glicose sanguínea, lactato, íons cloreto, magnésio e cálcio nos juvenis, foram coletadas amostras de sangue nos animais provenientes do tanque de aclimatação (controle: antes do transporte – AT), imediatamente após as quatro horas de simulação (PT), 24 e 96 horas após a simulação (24 PT e 96 PT, respectivamente), sendo utilizadas amostras de cinco peixes por tratamento. O sangue dos peixes foi coletado via punção caudal com seringas de 3 mL e, em seguida, centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos para obtenção do plasma. As concentrações de glicose sanguínea e lactato foram mensuradas utilizando um medidor digital, enquanto para os níveis de cloreto, magnésio e cálcio foram utilizados kits específicos (Labtest ®).

Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados nas caixas de depuração e imediatamente após o transporte. A temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica foram mensurados através de uma sonda modelo Hanna (HI S838), enquanto a amônia total foi determinada pelo método de Nessler, utilizando espectrofotometria. A amônia tóxica foi estimada de acordo com a metodologia de Emerson *et al.* (1975), a partir da seguinte equação:

$$\% \text{NH}_3^+ = \frac{100}{1 + 10^{(2755 / (273 + T) - \text{pH})}}, \text{ onde}$$

T: Temperatura da água

pH: Potencial hidrogeniônico da água

3.4 Análise estatística

O trabalho foi conduzido em dois delineamentos experimentais inteiramente casualizados e os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). Quando o valor de F indicou diferenças significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados estão apresentados como médias \pm desvio padrão e todas as análises foram realizadas pelo programa Bioestat, versão 4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I: Determinação da concentração ideal de óleo de cravo para o transporte

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água nos sacos plásticos avaliadas por tratamento imediatamente após a simulação de transporte encontram-se apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos da água após quatro horas de simulação de transporte em sacos plásticos sob influência de diferentes concentrações de óleo de cravo.

Parâmetro	Valor inicial	Final da simulação de transporte (concentrações de óleo de cravo)			
		5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹
Temperatura (°C)	26,80	29,1 ± 0,14 ^{a*}	28,8 ± 0,15 ^{ab*}	28,6 ± 0,68 ^{ab*}	28,1 ± 0,28 ^b
O ₂ D (mg L ⁻¹)	6,15	16,1 ± 0,68 [*]	16,8 ± 1,35 [*]	17,2 ± 0,96 [*]	18,3 ± 1,70 [*]
pH	7,35	6,5 ± 0,07 [*]	6,5 ± 0,08 [*]	6,4 ± 0,10 [*]	6,6 ± 0,22 [*]
Amônia (mg L ⁻¹)	0,55	2,44 ± 0,31 ^{a*}	2,70 ± 0,56 ^{a*}	1,85 ± 0,73 ^{ab*}	1,42 ± 0,22 ^{b*}
Condutividade (μS cm ⁻¹)	59,0	62,5 ± 0,58 ^{a*}	61,8 ± 0,96 ^{ab}	60,5 ± 1,73 ^{ab}	60,1 ± 0,82 ^b

* indica diferença significativa quando comparado com o valor inicial antes da simulação. Diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferença significativa entre os tratamentos após a simulação de transporte pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O óleo de cravo interferiu nos valores de temperatura após as quatro horas de simulação do transporte. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, quanto menor a concentração de óleo de cravo utilizada, maior foi a temperatura da água. Na concentração de 5 mg L⁻¹ a temperatura média atingiu 29,1 ± 0,14 °C, sendo mais elevada ($p < 0,05$) em relação temperatura média na maior concentração (20 mg L⁻¹), que foi de 28,1 ± 0,28 °C. Nas concentrações intermediárias de 10 e 15 mg L⁻¹ as temperaturas médias foram 28,8 ± 0,15 e

28,6 ± 0,68 °C, respectivamente, e não diferiram significativamente em relação aos demais tratamentos.

Os parâmetros oxigênio dissolvido e pH não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos após a simulação do transporte. Os elevados valores de O_2D ocorreram devido à injeção do gás nos sacos antes deles serem amarrados, indicando, possivelmente, uma supersaturação deste gás na água. Esta prática é muito comum e observada no transporte de peixes vivos em sistemas fechados.

Após as quatro horas de simulação de transporte, os sacos que continham 5 mg L⁻¹ de óleo de cravo apresentaram os menores valores de oxigênio dissolvido dentre todos os tratamentos, tendo em média 16,1 ± 0,68 mg L⁻¹. Também foi observado que nos sacos com maiores concentrações de anestésico ocorreu maior concentração de oxigênio dissolvido ao final do experimento, embora não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Segundo Berka (1986), o peso dos animais e a temperatura da água são os dois fatores mais importantes relacionados ao consumo de oxigênio durante o transporte de peixes vivos, de tal forma que a temperatura influencia fortemente o consumo do oxigênio, pois quanto maior a temperatura, maior será a demanda de oxigênio. Entretanto, no presente trabalho, o peso dos animais e a temperatura da água não variaram entre os tratamentos e não influenciaram no consumo do oxigênio.

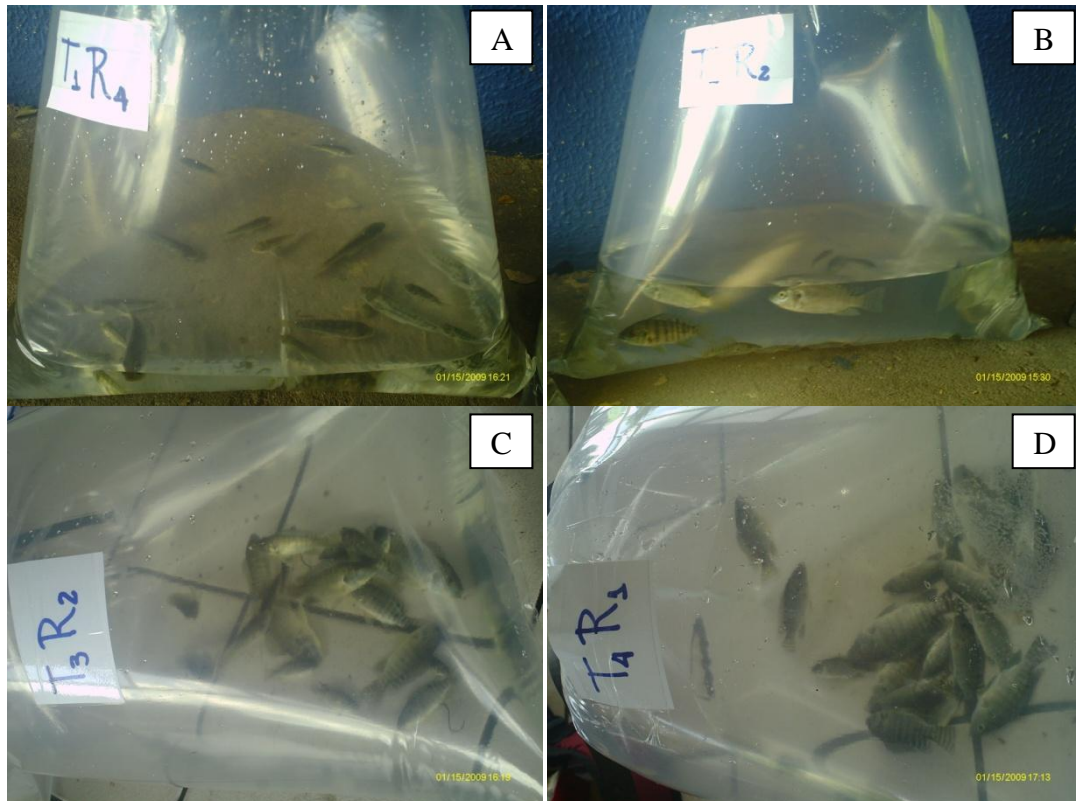
Os valores de pH da água de todos os tratamentos foram significativamente menores (6,4 a 6,6) em relação ao pH da água do tanque de aclimação que foi 7,35. Este decréscimo está relacionado com a produção de dióxido de carbono devido à respiração dos peixes, que leva a formação de ácido carbônico após sua dissociação em íons H⁺ e HCO₃⁻, acidificando ligeiramente a água (BOYD, 1982).

A concentração de amônia total, após as quatro horas de simulação de transporte, foi significativamente superior ($p < 0,05$) aquela observada no início do experimento (0,55 mg L⁻¹) em todos os tratamentos, variando de 1,42 a 2,70 mg L⁻¹. A concentração de nitrogênio amoniacal total na concentração de 20 mg L⁻¹ foi significativamente inferior ($P < 0,05$) que as demais concentrações.

Os peixes expostos às duas menores concentrações do anestésico aparentaram não estarem sedados (Figura 2A e 2B), enquanto os animais expostos às duas maiores dosagens de

óleo de cravo apresentavam-se claramente anestesiados (Figura 2C e 2D). Como os peixes das menores concentrações não estavam anestesiados, os mesmos mantinham-se com natação e metabolismo mais ativos, resultando em uma maior excreção de compostos nitrogenados.

Figura 2 – Exemplos de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos sob o efeito de diferentes concentrações de óleo de cravo*.



*A: 5 mg L⁻¹, B: 10 mg L⁻¹, C: 15 mg L⁻¹ e D: 20 mg L⁻¹.

Fonte: Arquivo pessoal.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Park *et al.* (2009b) que observaram uma maior redução da excreção de amônia total na maior concentração de cloridrato de lidocaína testada, ao simularem o transporte de *Pleuronectes americanus* em sacos plásticos durante cinco horas.

A condutividade elétrica não apresentou grande variação entre os tratamentos, alcançando o valor máximo de $62,5 \pm 0,58 \mu\text{S cm}^{-1}$ no tratamento com 5 mg L⁻¹ de óleo de cravo, que apenas diferiu significativamente do valor de $60,1 \pm 0,82 \mu\text{S cm}^{-1}$, obtido na maior na concentração de 20 mg L⁻¹.

Segundo King (2009), mudanças significativas na qualidade da água ocorrem durante o transporte, podendo afetar a atividade respiratória dos peixes e desencadear o estresse fisiológico. De acordo com os resultados do presente trabalho, se pode inferir que as concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo não foram capazes de minimizar os impactos causados pelo transporte, principalmente com relação à excreção de amônia. Para esta mesma variável, o tratamento com 20 mg L⁻¹ diminuiu significativamente a excreção deste composto tóxico, além de diminuir a perda de sais dos animais para a água (tabela 3).

Tabela 4 – Eventos comportamentais de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos sob influência de diferentes concentrações de óleo de cravo.

Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo de simulação de transporte (minutos)			
	60	120	180	240
	Estágios anestésicos			
5	I (100%)	I (100%)	I (100%)	I (100%)
10	I (100%)	II (100%)	II (100%)	II (100%)
15	I (50%)	III(40%)	IV(100%)	IV(100%)
	II (50%)	IV (60%)		
20	III (100%)	IV (50%)	V(100%)	VI(100%)
		V (50%)		

Conforme demonstra a tabela acima, as diferentes concentrações de óleo de cravo alteraram o comportamento dos indivíduos. Após 60 minutos de simulação de transporte em sacos plásticos, todos os peixes expostos ao óleo de cravo nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ encontravam-se no estágio 1 de anestesia (ver tabela 1), enquanto 50% dos indivíduos dos sacos que continham 15 mg L⁻¹ estavam no estágio 1 e os outros 50% no estágio 2. Oliveira *et al* (2009) submeteram alevinos de tilápia do Nilo ao transporte na concentração de 5 mg L⁻¹ do mesmo anestésico e observaram que 40% dos animais encontravam-se no estágio 1 de anestesia, resultado semelhante ao registrado no nosso trabalho. Neste mesmo período de tempo, todos os espécimes expostos à concentração de 20 mg L⁻¹ não demonstravam

equilíbrio e apresentavam o batimento opercular lento, porém regular, caracterizando o estágio 3 de anestesia.

Na metade do tempo de simulação de transporte, ou seja, duas horas, todos os peixes do tratamento com 5 mg L⁻¹ de óleo de cravo continuaram no mesmo estágio, enquanto todos os animais expostos à concentração de 10 mg L⁻¹ encontravam-se no estágio 2. Para esses dois tratamentos não foi observado mais nenhuma mudança em relação ao estágio de anestesia até o final da simulação de transporte. Segundo Akbari *et al.* (2010), a concentração anestésica desejável para o transporte de peixes deve produzir uma leve sedação, ou seja, não ultrapassar o estágio 1. Em contrapartida, Inoue *et al.* (2010) afirmaram que o estágio 1 não é suficiente para promover reduções nos parâmetros metabólicos que evidenciam o estresse, o que também foi evidenciado no presente trabalho.

Após as duas horas de simulação, 40% dos peixes expostos ao tratamento com 15 mg L⁻¹ do anestésico apresentavam natação errática e batimento opercular irregular, características do estágio 3 de anestesia, enquanto os 60% restantes estavam no estágio 4. Dos espécimes submetidos ao tratamento com 20 mg L⁻¹, 50% atingiram o estágio 4 de anestesia, enquanto 50% apresentavam batimento opercular lento e irregular, caracterizando o estágio 5.

Depois de três horas simulando o transporte, todos os peixes expostos à concentração de 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo encontravam-se no estágio 4 de anestesia, permanecendo assim até o fim do experimento, enquanto 100% dos peixes submetidos ao tratamento com 20 mg L⁻¹, encontravam-se no estágio 5. Entretanto, ao final do desafio imposto, os animais entraram aparentemente no estágio de colapso medular e apresentavam total ausência batimento opercular.

Após o período experimental, não foi observada nenhuma mortalidade aos peixes expostos às concentrações de 5, 10 e 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo, bem como 24 horas após o procedimento, enquanto 48% dos peixes expostos à maior concentração de óleo de cravo, 20 mg L⁻¹, não sobreviveram. Os peixes submetidos às concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ apresentaram capacidade normal de nado (estágio 5 de recuperação – ver tabela 2) imediatamente após terem sido colocados nas caixas de recuperação. Moreira *et al.* (2010) submeteram adultos de tilápia do Nilo à anestesia com o eugenol e afirmaram que os animais só necessitavam de tempo de recuperação se atingissem o estágio de anestesia profunda.

Os juvenis de tilápia expostos ao tratamento de 15 mg L⁻¹ retornaram parcialmente a natação após 20 minutos, caracterizando o estágio 2 de recuperação, e somente após 60 minutos todos os peixes estavam totalmente recuperados. Os animais sobreviventes submetidos ao tratamento com 20 mg L⁻¹ necessitaram de 80 minutos para voltar a nadar ativamente.

Para detectar se os animais estão passando por situações estressantes, indicadores fisiológicos como os níveis de cortisol e glicose sanguíneos (MARTÍNEZ-PORCHAS *et al.*, 2009) tem sido utilizados com sucesso e bem descritos na literatura, no entanto a necessidade da coleta de sangue representa um obstáculo. Na impossibilidade da coleta de material sanguíneo, o comportamento dos animais pode ser utilizado como indicativo de situações estressantes. Segundo Vera *et al.* (2010), o desenvolvimento de métodos precisos para quantificar mudanças comportamentais no peixes é de grande importância na ordem de caracterizar efeitos subletais causados pela exposição a substâncias xenobióticas (antibióticos, vacinas, anestésicos, etc.). Dentre as características comportamentais estão as taxas de batimento opercular (ventilação) e da nadadeira peitoral. A tabela 5 sumariza os dados referentes à frequência de batimento opercular dos juvenis de tilápia em sacos plásticos, durante quatro horas de simulação de transporte sob diferentes concentrações de óleo de cravo.

Tabela 5 – Frequência de batimento opercular (batimentos minuto⁻¹) durante a simulação de transporte de juvenis de tilápia do Nilo em sacos plásticos contendo diferentes concentrações de óleo de cravo. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes, nas colunas e linhas, respectivamente, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹
60 min	85,8 ± 6,4 ^{ab,A}	79,1 ± 14,0 ^{a,AB}	88,4 ± 4,1 ^{a,A}	65,5 ± 12,6 ^{a,B}
90 min	86,2 ± 7,3 ^{ab,A}	81,8 ± 12,1 ^{a,AB}	70,2 ± 9,6 ^{bd,BC}	55,9 ± 9,6 ^{ab,C}
120 min	88,9 ± 8,3 ^{ab,A}	81,2 ± 7,5 ^{a,A}	85,6 ± 6,5 ^{ac,A}	63,0 ± 9,5 ^{a,B}
150 min	87,0 ± 7,7 ^{ab,A}	84,2 ± 6,5 ^{a,A}	85,0 ± 5,9 ^{ac,A}	49,0 ± 7,6 ^{b,B}
180 min	94,8 ± 6,6 ^{b,A}	102,0 ± 5,5 ^{b,A}	80,1 ± 3,7 ^{bc,B}	49,9 ± 6,5 ^{b,C}
210 min	78,1 ± 11,6 ^{ac,A}	83,8 ± 8,2 ^{a,A}	66,0 ± 6,7 ^{d,B}	44,5 ± 6,4 ^{b,C}
240 min	71,5 ± 4,6 ^{c,AB}	73,2 ± 11,7 ^{a,A}	61,4 ± 6,5 ^{d,B}	*

* Nenhum peixe apresentava batimento opercular aparente.

Na concentração de 5 mg L⁻¹ de óleo de cravo, a taxa de ventilação dos juvenis de tilápia foi semelhante ($p > 0,05$) entre 60 e 210 minutos após o início da simulação de transporte, variando entre $78,1 \pm 11,6$ a $88,9 \pm 8,3$ batimentos por minuto (bpm). Uma exceção foi o valor registrado aos 180 minutos após o início da simulação, que registrou $94,8 \pm 6,6$ bpm, diferindo significativamente ao valor alcançado 210 minutos após o início. Moreira *et al.* (2010) utilizaram doses mais elevadas do mesmo anestésico que as utilizadas no presente trabalho e registraram valores de movimento opercular em adultos de tilápia do Nilo bem inferiores, variando entre 44,9 a 53,4 bpm. Esses resultados mostraram que a concentração de 5 mg L⁻¹ não foi suficiente para acalmar os animais durante o período experimental.

Somente quatro horas após o início da simulação de transporte que a taxa de ventilação, $71,5 \pm 4,6$ bpm, alcançou valor menor estatisticamente em relação ao registrado no primeiro momento de observação, que foi aos 60 minutos após o início da simulação. Nesta concentração (5 mg L⁻¹), os valores médios do batimento opercular apresentados pelos animais foram sempre maiores ($p < 0,05$) em relação aos dos expostos à concentração de 20 mg L⁻¹.

A concentração de 10 mg L⁻¹ causou nos peixes um comportamento bem semelhante ao observado na dosagem de 5 mg L⁻¹, com a taxa de ventilação aumentando consideravelmente a cada momento de amostragem até 210 minutos, com um máximo 3 horas depois de iniciada a simulação, apresentando em média $102,0 \pm 5,5$ bpm, o maior valor observado neste trabalho. Além disso, embora os movimentos operculares registrados na última amostragem ($73,2 \pm 11,7$ bpm) tenham alcançado valores menores em relação a 60 minutos após o início da simulação, não houve diferença significativa entre ambos.

Técnicas não invasivas, como a quantificação da taxa de ventilação opercular, podem ser utilizadas para avaliar parcialmente o estresse dos peixes em algumas situações quando não seja possível a retirada de sangue dos animais. Segundo Barreto e Volpato (2004), a taxa de ventilação é uma resposta muito sensível aos agentes estressantes, mas de uso limitado como único indicador de estresse, pois não fornece respostas diretamente proporcionais à altura do estressor. Desta forma, o comportamento apresentado pelos peixes expostos à concentração de 10 mg L⁻¹ pode indicar que esta concentração de óleo de cravo também não foi suficiente para diminuir o estresse causado pelo manejo.

Na concentração de 15 mg L⁻¹ houve uma redução significativa ($p < 0,05$) dos batimentos operculares logo entre os dois primeiros momentos de amostragens, registrando $88,4 \pm 4,1$ e $70,2 \pm 9,6$ bpm, respectivamente. Em seguida, embora tenha ocorrido um aumento na taxa de batimento opercular, os valores registrados com 120 e 150 minutos após o início da simulação de transporte, foram menores ($p > 0,05$) que o apresentado no primeiro momento de amostragem. E, finalmente, nas três últimas amostragens, foi observada uma redução gradativa na frequência opercular dos animais, sendo os valores registrados aos 210 e 240 minutos após o início da simulação, significativamente menores que todas as demais amostragens, apresentando valores de $66,0 \pm 6,7$ e $61,4 \pm 6,5$ bpm, respectivamente. Assim, a concentração de 15 mg L⁻¹ foi a que apresentou os melhores resultados ao avaliar a taxa de batimento opercular dos juvenis de tilápia.

Barreto e Volpato (2006) avaliaram o estresse em adultos de tilápia do Nilo submetidos a três diferentes agentes estressores (confinamento, eletrochoque e estresse social) e registraram valores basais variando entre 60 e 70 bpm antes dos desafios impostos aos animais. Esses dados revelam, possivelmente, que a taxa normal de batimento opercular para esta espécie oscile dentro deste intervalo. De acordo com as observações realizadas neste trabalho, os batimentos operculares foram decrescendo gradativamente até atingir estes valores, mesmo quando submetidos à simulação de transporte.

Os animais submetidos à simulação de transporte na maior dosagem de óleo de cravo apresentaram os menores valores de frequência opercular em todas as amostragens. Com 60 minutos após o início da simulação, os animais apresentaram $65,5 \pm 12,6$ bpm, não diferindo estatisticamente da frequência opercular dos animais amostrados com 90 e 120 minutos depois. Em seguida, os juvenis apresentaram batimento opercular muito lento, com média de $49,0 \pm 7,6$, $49,9 \pm 6,5$ e $44,5 \pm 6,4$ bpm nas observações realizadas aos 150, 180 e 210 minutos de simulação, respectivamente, diferindo significativamente dos minutos anteriores. De acordo com a figura 3D, podemos observar que a redução dos batimentos operculares nesta concentração ocorreu de uma forma bem mais aguda em relação aos demais tratamentos (Figuras 3A, 3B e 3C).

Figura 3 – Efeito de diferentes concentrações de óleo de cravo na frequência opercular (batidas min^{-1}) de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos. A: 5 mg L^{-1} ; B: 10 mg L^{-1} ; C: 15 mg L^{-1} ; D: 20 mg L^{-1} .

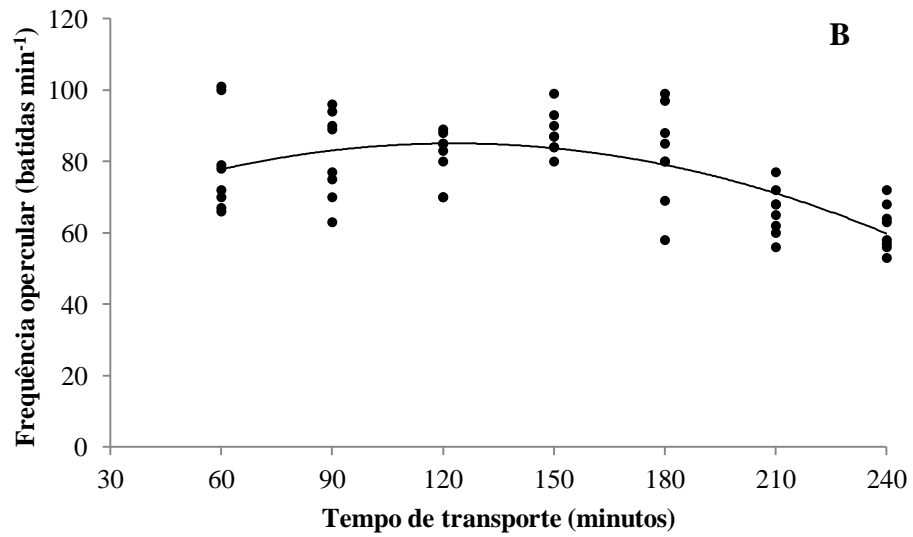
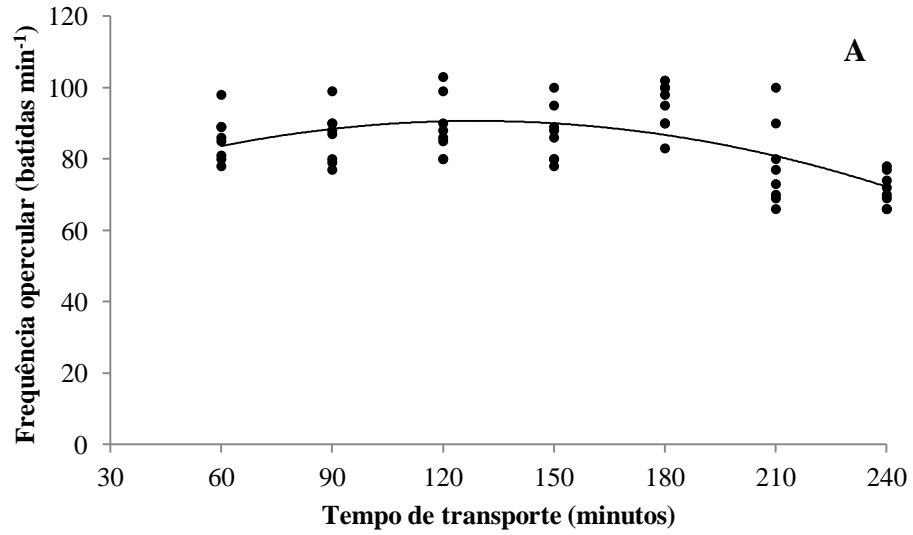
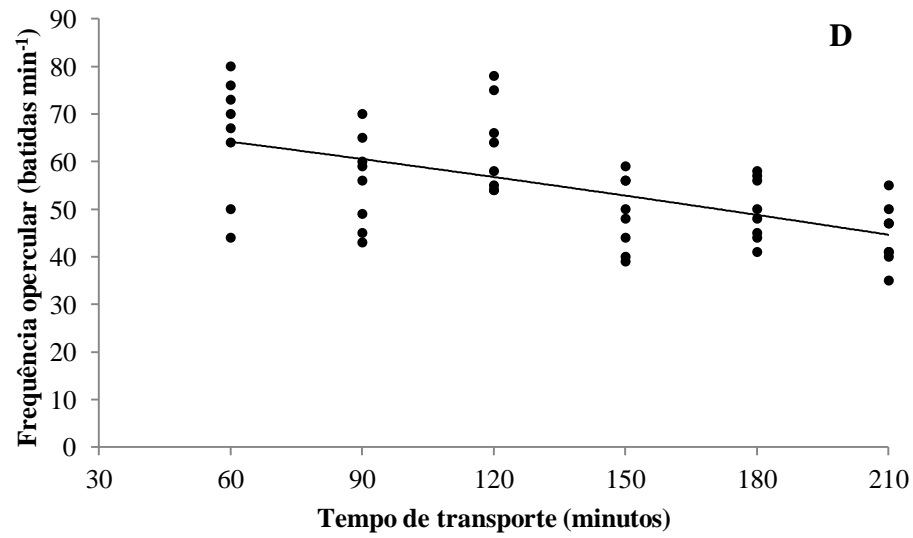
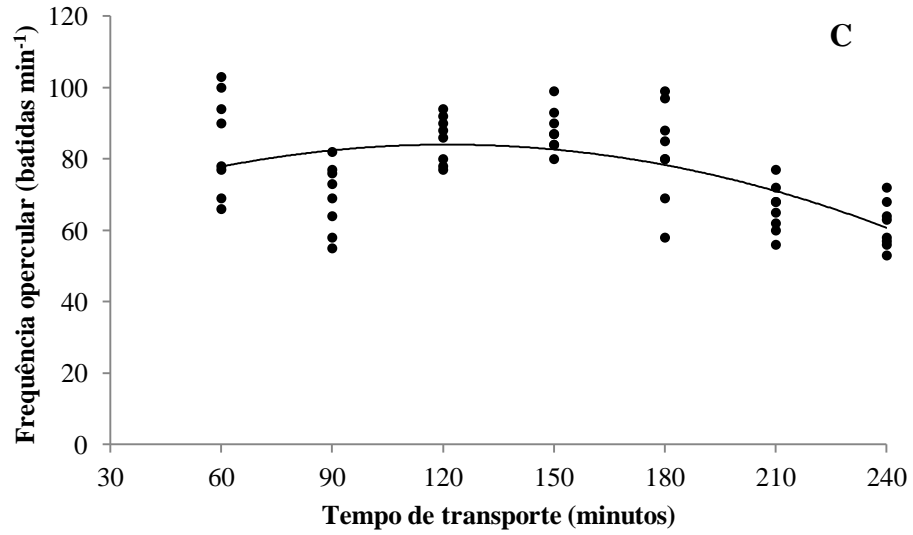


Figura 3 (cont) – Efeito de diferentes concentrações de óleo de cravo na frequência opercular (batidas min^{-1}) de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos. A: 5 mg L^{-1} ; B: 10 mg L^{-1} ; C: 15 mg L^{-1} ; D: 20 mg L^{-1} .



Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que na concentração de 20 mg L⁻¹ de óleo de cravo os animais ultrapassaram o estágio de anestesia desejado para o transporte, comprometendo a utilização desta dose para tal fim. Ao final da simulação, a maioria dos peixes não apresentava mais batimento opercular, enquanto a minoria apresentava batimentos operculares quase imperceptíveis. De acordo com Mylonas *et al.* (2005), quando o peixe se encontra neste estágio pode haver graves consequências e é necessário transferir o animal o quanto antes para água limpa, pois o não retorno do tônus muscular e dos movimentos operculares, poderá levá-lo eventualmente a morte.

A tabela 6 mostra os dados referentes à frequência dos batimentos da nadadeira peitoral dos juvenis de tilápia, submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos, sob a indução anestésica com diferentes concentrações de óleo de cravo. Os peixes dos sacos contendo as duas maiores concentrações do anestésico não foram utilizados, pois com 60 minutos de simulação, os mesmos já não apresentaram batimento da nadadeira peitoral.

Tabela 6 – Frequência do batimento da nadadeira peitoral (batimento minuto⁻¹) durante a simulação de transporte de juvenis de tilápia do Nilo em sacos plásticos contendo diferentes concentrações de óleo de cravo. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes, nas colunas e linhas, respectivamente, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹
60 min	117,2 ± 6,7 ^{ab,A}	93,1 ± 15,1 ^{a,B}	*	*
90 min	119,8 ± 7,3 ^{ab,A}	113,4 ± 6,0 ^{bc,A}	*	*
120 min	127,0 ± 11,2 ^{a,A}	115,9 ± 17,8 ^{c,A}	*	*
150 min	121,9 ± 15,7 ^{ab,A}	116,2 ± 6,4 ^{c,A}	*	*
180 min	114,0 ± 18,6 ^{ab,A}	111,6 ± 10,6 ^{bc,A}	*	*
210 min	111,4 ± 15,2 ^{ab,A}	104,5 ± 9,7 ^{abc,A}	*	*
240 min	104,1 ± 8,9 ^{b,A}	97,4 ± 8,2 ^{ab,A}	*	*

* Nenhum peixe apresentava batimento da nadadeira peitoral aparente.

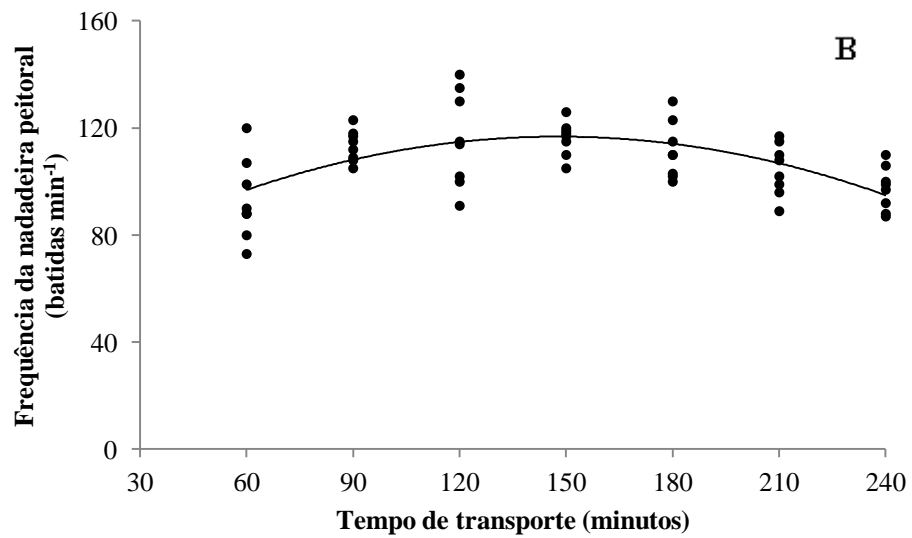
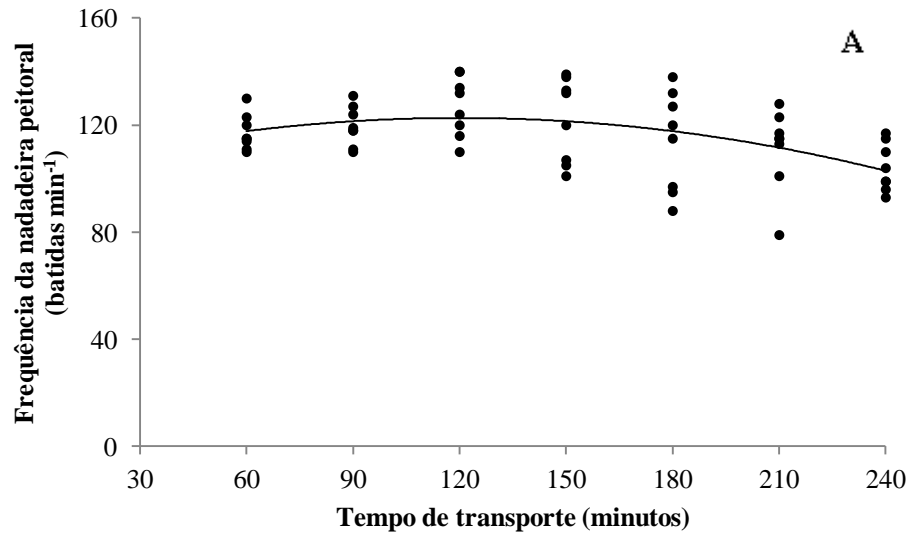
Os peixes expostos à concentração de 5 mg L⁻¹ praticamente não apresentaram modificações significativas em relação a este parâmetro comportamental, e com 240 minutos após o início da simulação (104,1 ± 8,9 bpm), houve uma redução significativa (p < 0,05) em relação ao valor registrado com 60 minutos (117,2 ± 6,7 bpm)

Diferente do tratamento anterior, os batimentos da nadadeira peitoral dos peixes expostos à concentração de 10 mg L^{-1} aumentaram significativamente após 90 minutos, só retornando a valores semelhantes à primeira amostragem (60 minutos) após 120 minutos de simulação. Vale salientar que em todas as amostragens realizadas, o número de batimentos da nadadeira peitoral dos peixes submetidos ao tratamento com 10 mg L^{-1} de óleo de cravo foi sempre menor que a dos animais expostos à concentração de 5 mg L^{-1} .

Cooke *et al.* (2004) utilizaram as mesmas dosagens do óleo de cravo no transporte durante trinta minutos do peixe de água doce *Micropterus salmoides*. Os referidos autores observaram uma taxa de batimento opercular média de $5,5 \pm 1,0 \text{ bpm}$, quando os animais foram expostos às maiores concentrações ($15 - 20 \text{ mgL}^{-1}$) e de $66,3 \pm 1,8 \text{ bpm}$, ao transportarem os peixes em concentrações menores ($0,0 - 4,9 \text{ mg L}^{-1}$).

No trabalho supracitado, os autores encontraram uma relação negativa significativa entre a dosagem de óleo de cravo utilizada e o número de batimentos da nadadeira peitoral. Conforme mostra a figura 4, no presente trabalho o tipo de curva que mais se adequou aos nossos resultados foi uma regressão polinomial, diferindo de Cooke *et al.* (2004) que demonstraram a partir de uma correlação linear negativa o mesmo comportamento.

Figura 4 – Efeito de diferentes concentrações de óleo de cravo na taxa de batimento da nadadeira peitoral (batidas min^{-1}) de juvenis de tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos. A: 5 mg L^{-1} ; B: 10 mg L^{-1}



Conforme o exposto, as concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ não são indicadas para a realização de transporte, pois além de não promover a anestesia desejada, também não foram capazes neste trabalho de minimizar os problemas com a qualidade da água. Por outro lado, apesar do tratamento com 20 mg L⁻¹ ter diminuído a excreção de amônia e de sais dos peixes para a água, essa dosagem fez com os peixes ultrapassassem o estágio de anestesia desejado, culminando no colapso medular dos animais e, conseqüentemente, elevada taxa de mortalidade. Desta forma, de acordo com os critérios adotados, a concentração de óleo de cravo mais indicada para o transporte de juvenis de tilápia é de 15 mg L⁻¹.

4.2 Experimento II: Efeito de diferentes densidades no transporte sob indução anestésica

Conforme mostra a tabela 7, oxigênio dissolvido, temperatura, pH e amônia tóxica não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as densidades utilizadas. Em relação a estes parâmetros, apenas o pH encontrou-se em faixa desconfortável para os peixes, conforme Boyd e Tucker (1998), porém não letal. A diminuição do pH já era esperado devido a respiração do peixes, resultando na liberação de CO_2 e conseqüente acidificação do meio.

Tabela 7 – Parâmetros físico-químicos da água após quatro horas de simulação de transporte em sacos plásticos sob influência de diferentes densidades.

Parâmetro	Valor inicial	Final da simulação de transporte (Densidades testadas)		
		140 g L ⁻¹	245 g L ⁻¹	350 g L ⁻¹
O ₂ D (mg L ⁻¹)	4,85	11,45 ± 0,20*	11,42 ± 0,35*	10,99 ± 0,16*
Temperatura (°C)	25,36	28,13 ± 0,29*	28,29 ± 0,25*	28,40 ± 0,23*
pH	7,30	6,06 ± 0,07*	6,05 ± 0,04*	5,99 ± 0,06*
Amônia Total (mg L ⁻¹)	0,07	4,24 ± 0,25 ^{a*}	4,90 ± 0,37 ^{a*}	6,30 ± 0,58 ^{b*}
Amônia Tóxica (mg L ⁻¹)	0,0008	0,0035 ± 0,0006*	0,0041 ± 0,0002*	0,0045 ± 0,0008*
Condutividade (µS cm ⁻¹)	61	73,25 ± 1,89 ^{a*}	76,75 ± 5,74 ^{ab*}	82,10 ± 3,92 ^{b*}

* indica diferença significativa quando comparado com o valor inicial antes da simulação. Diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferença significativa entre os tratamentos após a simulação de transporte pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Semelhante aos nossos resultados, ao simular o transporte de juvenis de jundiás, *Rhamdia quelen*, em quatro diferentes densidades (75, 150, 250 e 350 g L⁻¹), durante quatro horas, Carneiro *et al.* (2009) não obtiveram diferença significativa na temperatura entre todos os tratamentos.

Quando os peixes são transportados em sistemas fechados, pode ocorrer um déficit de oxigênio quando a densidade utilizada é alta, ou quando o transporte for realizado por um

longo período (GOLOMBIESKI *et al.*, 2003). No presente estudo, a concentração de O₂D ao final de quatro horas de simulação foi mantida em níveis bem superiores ($P < 0,05$) ao valor inicial, e sem diferença significativa entre os tratamentos.

A amônia total aumentou significativamente ($p < 0,05$) na água em todos os tratamentos após as quatro horas. Pudemos observar uma relação direta entre o aumento da densidade e a concentração deste composto na água. O mesmo comportamento foi evidenciado com juvenis de jundiás, *Rhamdia quelen*, submetidos ao transporte de três horas nas densidades de 75, 150, 250 e 350 g L⁻¹ (CARNEIRO *et al.*, 2009).

Níveis de amônia total acima de 0,5 mg L⁻¹ podem ser considerados prejudiciais aos peixes (GOLOMBIESKI *et al.*, 2005). No presente estudo, a utilização do óleo de cravo foi incapaz de minimizar este problema independente da densidade. Segundo Gonçalves *et al.* (2010), elevadas concentrações deste composto são preocupantes, pois como agente estressor, este composto pode desencadear a liberação de corticosteróides na circulação sanguínea, desencadeando respostas metabólicas, iônicas e hematológicas características do estresse. No entanto, os valores de amônia tóxica mantiveram-se bem abaixo de 0,32 mg L⁻¹, concentração letal para peixes por uma exposição de 96 horas, segundo Abdalla e MacNabb (1998).

A condutividade elétrica antes do transporte foi de 61 μS cm⁻¹, aumentando significativamente após o ensaio, sendo mais elevada quanto maior a densidade, alcançando o pico de 82,10 ± 3,92 μS cm⁻¹ no tratamento de 350 g L⁻¹. Esta elevação da condutividade elétrica indica que durante o experimento, ocorreu perda de íons para a água como uma resposta aos fatores estressantes (SEIDELIN *et al.*, 1999).

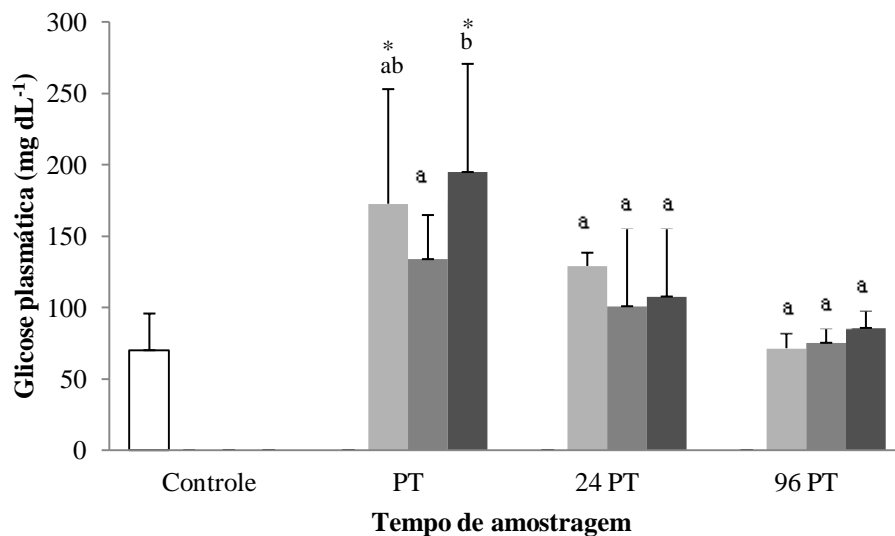
Os níveis de amônia total e condutividade da água após quatro horas de simulação de transporte com 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo, comprometeram bastante a qualidade da água. As altas densidades utilizadas podem ter sido o fator preponderante para o aumento destes parâmetros, uma vez que a dosagem de anestésico utilizada não foi capaz de minimizar a excreção de amônia, bem como a perda de íons dos peixes para a água.

O rápido crescimento da aquicultura brasileira é responsável pela demanda crescente de estudos científicos em todas as áreas de sua cadeia produtiva, dentre elas o transporte de peixes vivos (CARNEIRO *et al.*, 2002). O uso de indicadores vem sendo testado para elaboração de protocolos de transporte seguros para as espécies de interesse, dentre elas a tilápia do Nilo. Através dos parâmetros hormonais, iônicos e hematológicos pode-se inferir se

o possível agente mitigador do estresse está ou não minimizando as injúrias causadas por esta prática.

De acordo com a figura 5, o perfil de glicemia apresentado pelos juvenis de tilápia submetidos à simulação nas densidades de 140 e 350 g L⁻¹, mostrou que imediatamente após a abertura dos sacos, os animais apresentaram alterações típicas do estresse. Estes dois tratamentos registraram 172,6 ± 77,27 e 194,80 ± 75,77 mg dL⁻¹, diferindo significativamente do grupo controle, que apresentou 70,0 ± 25,7 mg dL⁻¹, confirmando a resposta metabólica secundária do estresse. Os animais que estavam na densidade de 245 g L⁻¹ apresentaram uma elevação no teor de glicose (133,80 ± 30,88 mg dL⁻¹), no entanto não foi diferente estatisticamente em relação aos animais do grupo controle.

Figura 5 – Efeito do óleo de cravo (15 mg L⁻¹) na glicose plasmática de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.



* indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Diferentes letras minúsculas nas barras indicam diferença significativa entre os tratamentos (□ 140 g L⁻¹; ▒ 245 g L⁻¹; ■ 350 g L⁻¹) dentro de cada tempo avaliado pelo teste de Tukey (p < 0,05). PT – imediatamente após a simulação; 24PT e 96 PT – 24 e 96 horas de descanso após a simulação, respectivamente.

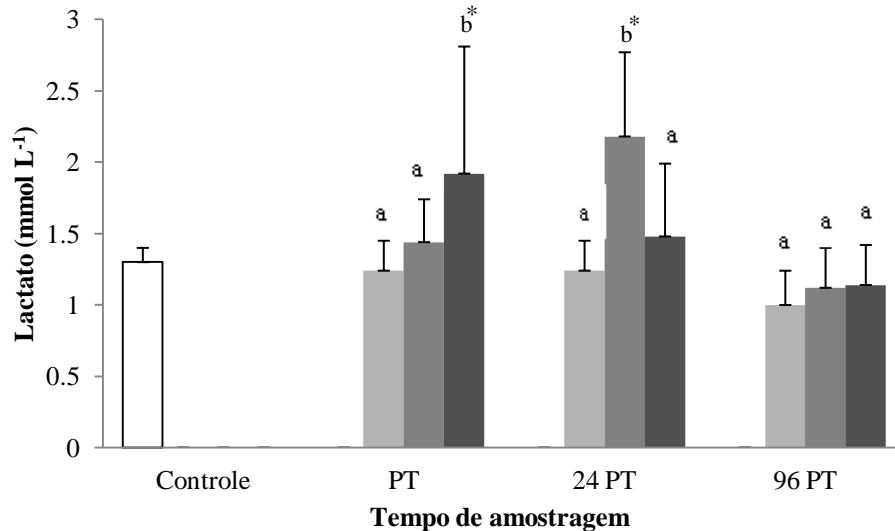
O aumento do teor de glicose na corrente sanguínea indica um maior consumo de energia e uma resposta metabólica mais elevada (MOREIRA *et al.*, 2011). Elevação significativa no teor de glicose plasmática não foi evidenciada em juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, após atividade física intensa durante a captura, o que sugere que o estímulo da perseguição aplicado não foi suficiente para gerar resposta de estresse suficiente para alterar esse indicador (HOSHIBA *et al.*, 2009).

No presente estudo, os animais de todos os tratamentos apresentaram concentrações de glicose semelhantes ($p > 0,05$) ao do grupo controle após 24 horas, demonstrando que a tilápia pode restabelecer sua condição normal de forma relativamente rápida, desde que o estresse agudo seja removido. Juvenis de jundiás demonstraram o mesmo comportamento quando submetidos ao transporte durante quatro horas nas densidades de 75, 150, 250 e 350 g L⁻¹ (CARNEIRO *et al.*, 2009).

Os peixes submetidos ao tratamento com a maior densidade (350 g L⁻¹), amostrados imediatamente após a simulação (figura 6), apresentaram um aumento nos teores de lactato, alcançando $1,92 \pm 0,69$ mmol L⁻¹, que diferiu significativamente das outras duas densidades e do grupo controle ($1,3 \pm 0,1$ mmol L⁻¹). A densidade intermediária apresentou, em média, $1,44 \pm 0,30$ mmol L⁻¹, não diferindo dos animais da menor densidade, que registraram $1,24 \pm 0,21$ mmol L⁻¹. Juvenis de pirarucu apresentaram respostas diferentes ao transporte de três horas em sacos plásticos, pois os valores de lactato diminuíram logo após o desafio imposto (BRANDÃO *et al.*, 2006).

Após 24 horas, o teor de lactato dos peixes da densidade intermediária (245 g L⁻¹) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos outros dois tratamentos e ao grupo controle. Esse aumento pode estar relacionado ao intenso trabalho realizado pelo metabolismo anaeróbico, sendo o lactato o principal metabólito produzido (BARBOSA *et al.*, 2007). Segundo os mesmos autores, isso ocorre quando a demanda energética é tão alta que o metabolismo aeróbico sozinho não é capaz de sustentar suas necessidades energéticas.

Figura 6 – Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no lactato de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.



* indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Diferentes letras minúsculas nas barras indicam diferença significativa entre os tratamentos (□ 140 g L^{-1} ; ▒ 245 g L^{-1} ; ■ 350 g L^{-1}) dentro de cada tempo avaliado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). PT – imediatamente após a simulação; 24PT e 96 PT – 24 e 96 horas de descanso após a simulação, respectivamente.

Em relação aos dois parâmetros bioquímicos avaliados, o uso do anestésico com o intuito de diminuir as respostas do estresse, não foi satisfatório neste trabalho. Houve elevação no nível de glicose nas densidades 140 e 350 g L^{-1} imediatamente ao término da simulação, e o teor de lactato dos peixes da densidade 245 g L^{-1} teve incremento 24 horas depois, indicando que os animais não conseguiram manter a homeostase inicial.

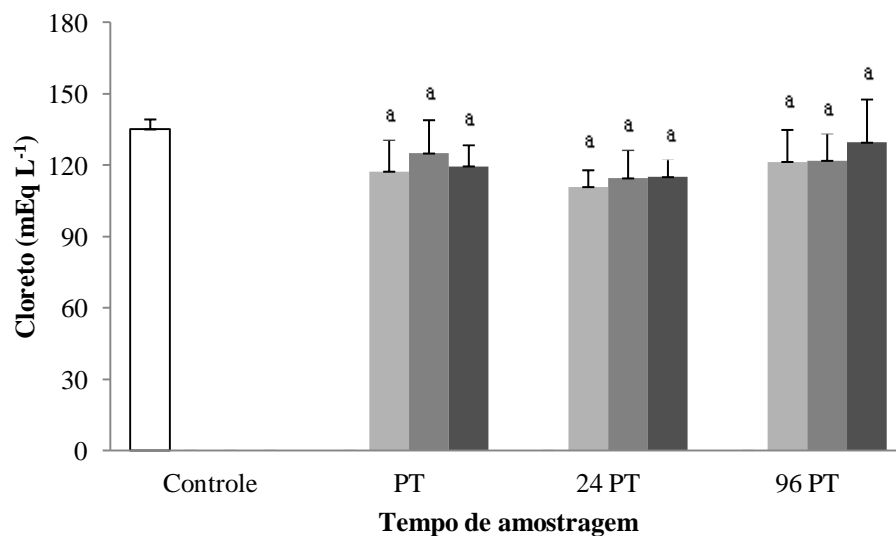
Distúrbios osmorregulatórios podem ser induzidos pelo estresse (MACDONALD; MILLIGAN, 1997). A regulação iônica, mantendo as concentrações dos fluidos em certos limites, pode ser utilizada como medida de estresse, sendo a extrapolação desses limites uma situação estressante característica.

Os níveis de cloreto não registraram nenhuma mudança nos peixes submetidos à simulação de transporte independente da densidade utilizada. Os teores de cloreto foram menores ($p > 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($135,1 \pm 4,2 \text{ mEq L}^{-1}$) em todas as amostragens realizadas independente da densidade, de forma semelhante ao observado por Fosberg *et al.* (2001). Dentre os tratamentos, o pico de cloreto foi registrado 96 horas após a

simulação de transporte ao utilizar a maior densidade, alcançando $129,52 \pm 18,18 \text{ mEq L}^{-1}$, enquanto o menor valor registrado foi de $110,87 \pm 7,08 \text{ mEq L}^{-1}$, 24 horas após o desafio ao utilizar a menor densidade (figura 7).

A simulação de transporte de juvenis de jundiás, *Rhamdia quelen*, em sacos plásticos em quatro densidades, também não resultou em diferença significativa nos valores de cloreto, apresentando valores variando entre $117,1 \pm 5,8$ e $126,9 \pm 6,4 \text{ mEq L}^{-1}$ (CARNEIRO *et al.*, 2009). Em contrapartida, diferentes densidades utilizadas nos transporte de alevinos de *Labeo rohita*, resultaram em mudanças significantes na concentração deste eletrólito (HASAN; BART, 2007).

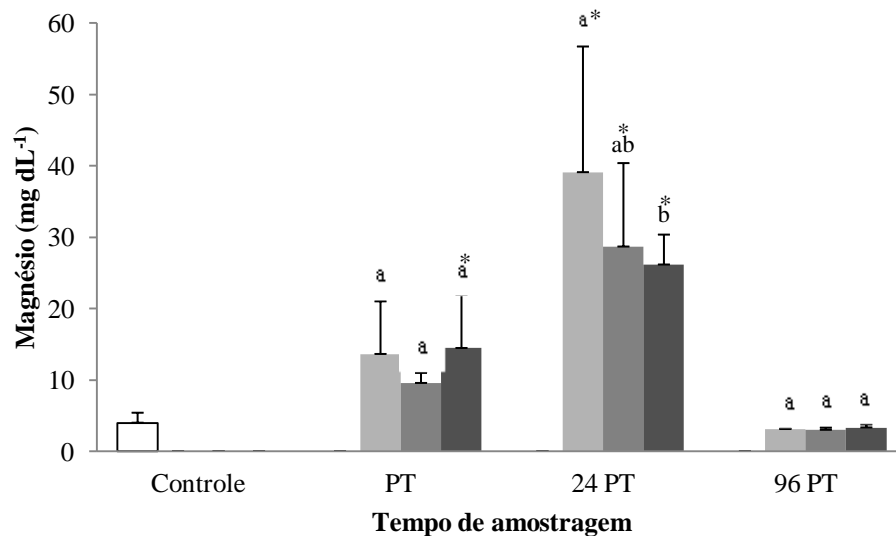
Figura 7 – Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no cloreto plasmático de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.



* indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Diferentes letras minúsculas nas barras indicam diferença significativa entre os tratamentos (□ 140 g L⁻¹; ▒ 245 g L⁻¹; ■ 350 g L⁻¹) dentro de cada tempo avaliado pelo teste de Tukey (p < 0,05). PT – imediatamente após a simulação; 24PT e 96 PT – 24 e 96 horas de descanso após a simulação, respectivamente.

De acordo com a figura 8, a quantidade de magnésio no plasma dos juvenis de tilápia antes do transporte apresentou, em média, $4,0 \pm 1,4 \text{ mg dL}^{-1}$. Após as quatro horas de simulação do transporte, os peixes das três densidades testadas aumentaram o teor do íon Mg^{+2} , não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, entretanto, o valor obtido na maior densidade (350 g L^{-1}) foi significativamente ($p < 0,05$) mais elevado em relação ao controle, alcançando $14,47 \pm 7,44 \text{ mg dL}^{-1}$. Iversen *et al.* (2009) ao submeterem o salmão, *Salmo salar*, com peso médio de $71,8 \text{ g}$ ao transporte utilizando o óleo de cravo, também observaram que imediatamente após o desafio imposto, houve um aumento significativo de magnésio no plasma dos peixes comparado ao grupo controle (antes do transporte).

Figura 8 – Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no magnésio plasmático de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.



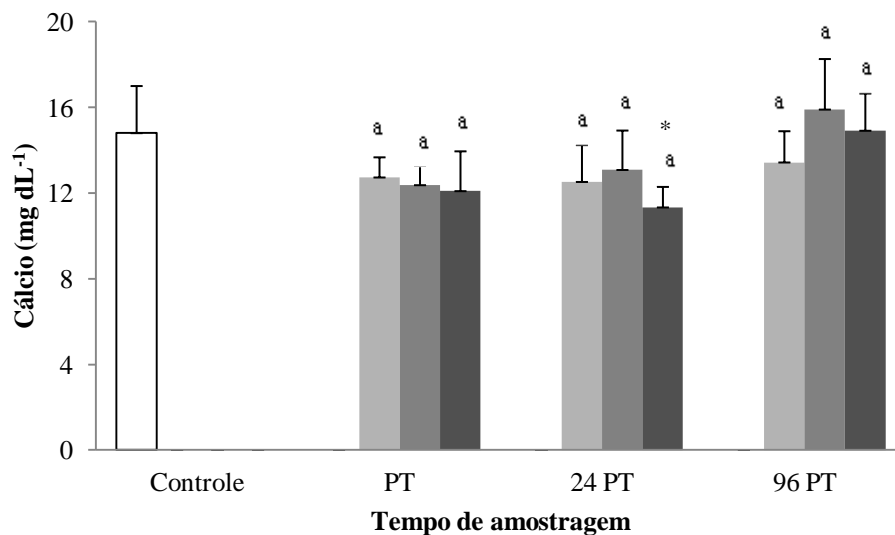
* indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Diferentes letras minúsculas nas barras indicam diferença significativa entre os tratamentos (□ 140 g L⁻¹; ▒ 245 g L⁻¹; ■ 350 g L⁻¹) dentro de cada tempo avaliado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). PT – imediatamente após a simulação; 24PT e 96 PT – 24 e 96 horas de descanso após a simulação, respectivamente.

Vinte quatro horas depois da simulação, o teor de Mg^{+2} no plasma dos peixes alcançou o pico em todas as densidades testadas, sendo registrado o maior valor na menor densidade ($39,10 \pm 17,60 \text{ mg dL}^{-1}$), que também foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao obtido no tratamento de maior densidade ($26,16 \pm 4,19 \text{ mg dL}^{-1}$). Os peixes da

densidade intermediária apresentaram valores de $28,68 \pm 11,69 \text{ mg dL}^{-1}$, não diferindo ($p > 0,05$) dos demais tratamentos.

Nossos resultados estão de acordo com os de Iversen e Eliassen (2009) que avaliaram as respostas secundárias de salmões, com peso médio de 56,9 g, submetidos ao transporte na presença do anestésico sintético “AQUI-S”. No presente trabalho, os valores de Mg^{+2} retornaram aos níveis basais 96 horas após a simulação do transporte nas três densidades testadas.

Figura 9 – Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) no cálcio plasmático de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades.



* indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Diferentes letras minúsculas nas barras indicam diferença significativa entre os tratamentos (□ 140 g L⁻¹; ■ 245 g L⁻¹; ■ 350 g L⁻¹) dentro de cada tempo avaliado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). PT – imediatamente após a simulação; 24PT e 96 PT – 24 e 96 horas de descanso após a simulação, respectivamente.

Em relação ao teor de cálcio, o grupo controle apresentou $14,8 \pm 2,2 \text{ mg dL}^{-1}$ (figura 9). Imediatamente após a simulação, houve uma redução ($p > 0,05$) deste valor para $12,73 \pm 0,94$, $12,37 \pm 0,90$ e $12,09 \pm 1,86 \text{ mg dL}^{-1}$, para os tratamentos 140, 245 e 350 g L⁻¹, respectivamente, não havendo diferença significativa dentre eles, nem em relação ao controle. Vinte e quatro horas após a simulação, esses níveis mantiveram-se nas duas menores densidades, enquanto os peixes submetidos à maior densidade reduziram significativamente a

concentração de cálcio no plasma para $11,33 \pm 0,96 \text{ mg dL}^{-1}$, diferindo ($p < 0,05$) em relação ao controle e restabeleceram seu nível basal 96 horas depois da simulação.

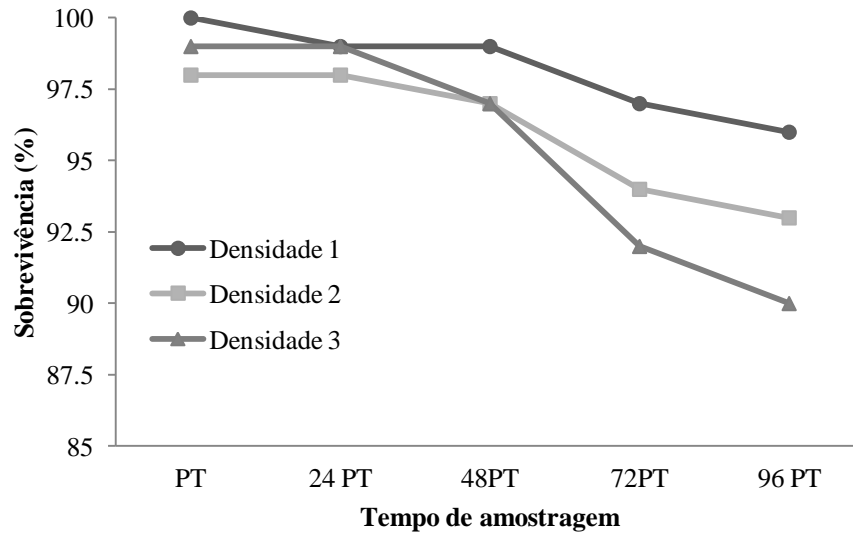
A pouca oscilação nos níveis de cálcio também foi evidenciado por Velisek *et al.* (2011) ao compararem o efeito de quatro anestésicos (2-fenoxietanol, óleo de cravo, MS222 e propiscina) na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss.*, imediatamente após a anestesia e 24 horas depois. Em contrapartida, exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*, apresentaram modificações significativas na concentração de cálcio plasmática ao serem submetidos ao transporte durante três horas, na presença de diferentes quantidades de sal na água (GOMES *et al.*, 2006b).

Os peixes possuem a capacidade osmorregulatória que lhes conferem a capacidade de manter a pressão osmótica constante independente do meio externo, estabelecendo a homeostase. Neste sentido, as brânquias possuem um importante papel, pois são responsáveis pelo balanço eletrolítico e homeostático dos teleósteos (CARNEIRO; URBINATI, 2001). Segundo os mesmos autores, situações estressantes acarretam o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade das brânquias, causado principalmente pela ação das catecolaminas. A mudança na permeabilidade das brânquias causa um sério distúrbio osmorregulatório em peixes de água doce (McDONALD; MILLIGAN, 1997).

No presente estudo, com exceção do Mg^{+2} que apresentou alterações significativas em seu perfil, a utilização de 15 mg L^{-1} de óleo de cravo nas três densidades, minimizou o distúrbio iônico do Cl^- e Ca^{+2} causado pela simulação de transporte.

Segundo Urbinati *et al.* (2004), a diminuição no ganho de peso, aumento da susceptibilidade a doenças e desequilíbrios iônicos provenientes do estresse, podem levar os peixes à mortalidade imediata ou posterior. No presente estudo, a sobrevivência foi monitorada desde a abertura dos sacos até 96 horas após o término do experimento (figura 10). A menor densidade apresentou uma sobrevivência de 96%, enquanto a densidade intermediária teve sobrevivência de 93% e, finalmente, os peixes submetidos à maior densidade alcançaram uma sobrevivência de 90%. Nossos resultados foram semelhantes aos de Gonçalves *et al.* (2010), ao submeterem juvenis de curimatá, *Prochilodus lineatus*, ao transporte em três densidades, e diferentes dos resultados de Fagundes e Urbinati (2008), que não obtiveram nenhuma mortalidade ao transportar juvenis de pintados, *Pseudoplatystoma corruscans*.

Figura 10 – Efeito do óleo de cravo (15 mg L^{-1}) na sobrevivência de juvenis de tilápia submetidos à simulação de transporte em sacos plásticos em diferentes densidades*.



* Densidade 1: 140 g L^{-1} ; Densidade 2: 245 g L^{-1} e Densidade 3: 350 g L^{-1} . PT – imediatamente após a simulação; 24PT, 48PT, 72PT e 96 PT – 24, 48, 72 e 96 horas de descanso após a simulação, respectivamente.

De maneira geral, podemos inferir que a adição de 15 mg L^{-1} de óleo de cravo no transporte de juvenis de tilápia do Nilo nas densidade de 140, 245 e 350 g L^{-1} , se mostrou incapaz de minimizar as respostas ao estresse. Os animais submetidos à simulação do transporte apresentaram alterações metabólicas e iônicas compatíveis com um quadro de estresse.

Diferentes relações entre a concentração anestésica e a densidade de estocagem, além de mais parâmetros fisiológicos e tipos de anestésicos, podem ser testados e avaliados para elaboração de um protocolo para transporte de juvenis de tilápias.

5. CONCLUSÃO

Após a realização deste trabalho, podemos concluir que:

- ✓ A concentração de óleo de cravo mais indicada para o transporte de juvenis de tilápias foi de 15 mg L^{-1} ;
- ✓ O anestésico não foi capaz de minimizar a elevação das variáveis metabólicas glicose e lactato. Quanto às variáveis iônicas, com exceção do Mg^{+2} , a utilização do óleo de cravo conseguiu manter os níveis plasmáticos dos íons Cl^- e Ca^{+2} ;
- ✓ Dentre as densidades testadas, a de 350 g L^{-1} indicou os piores valores nas variáveis avaliadas, além de causar maior mortalidade aos animais;
- ✓ O uso do óleo de cravo apresentou pouco efeito preventivo às respostas estressantes causadas pelo manejo, podendo ter atuado inclusive como agente estressor adicional.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. A.; MACNABB, C. D. **Acute and sublethal growth effects of um-ionized to nile tilapia**. 1998. Disponível em: <http://www.hep.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress1998/nitrogen>.
- ACERETE, L.; BALASCH, J. C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v. 237, p. 167-178, 2004.
- ADAMANTE, W. B.; NUÑER, A. P. O.; BARCELLOS, L.; SOSO, A. B.; FINCO, J. A. Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and times of transportation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 755-761, 2008.
- AKBARI, S.; KHOSHOD, M. J.; RAJAIAN, H.; AFSHARNASAB, M. The use of eugenol as an anesthetic in transportation of with indian shrimps (*Fenneropenaeus indicus*) post larvae. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 10, p. 423-429, 2010.
- ALTUN, T.; BILGIN, R.; DANABAS, D. Effects of sodium bicarbonate on anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, p. 29-31, 2009.
- BARBOSA, L. G.; MORAES, G.; INOUE, L. A. K. A. Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 255-260, 2007.
- BARCELLOS, L. J. G.; NICOLAIEWSKY, S.; DE SOUZA, S. M. G.; LULHIER, F. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 887-892, 1999a.
- BARCELLOS, L. J. G.; NICOLAIEWSKY, S.; DE SOUZA, S. M. G.; LULHIER, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 437-444, 1999b.
- BARRETO, R. E.; VOLPATO, G. L. Caution for using ventilator frequency as an indicator of stress in fish. **Behavioural Processes**, v. 66, p. 43-51, 2004.

BARRETO, R. E.; VOLPATO, G. L. Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors. **Journal of Experimental Animal Science**, v. 43, p. 189-196, 2006.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture com emphasis on the responses and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, n. 2, p. 3-26, 1991.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference of to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, 517-525, 2002.

BERKA, R. **The transport of live fish. A review.** EIFAC Technical Paper 48, 1986. 52 p.

BERNATZEDER, A. K.; COWLEY, P. D.; HECHT, T. Effect of short term exposure to the 2-phenoxyethanol on plasma osmolality of juvenile dusk kob, *Argyrosomus japonicus* (Sciaenidae). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, p. 303-305, 2008.

BILLER, J. D.; BENDHACK, F.; TAKAHASHI, L. S.; URBINATI, E. C. Stress responses in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to repeated air exposure. **Acta Scientiarum. Animal Science**, v. 30, n. 1, p. 89-93, 2008.

BOYD, C. E. **Water Quality Management for Ponds Fish Culture.** Elsevier, Amsterdam, 1982. 318 p.

BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Pond aquaculture water quality management.** Boston: Kluwer Academic. 1998. 700p.

BOYER, S. E.; WHITE, J. S.; STIER, A. C.; OSENBERG, C. W. Effects of the fish anesthetic, clove oil (eugenol), on coral health and growth. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 369, p. 53-57, 2009.

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

BOSWORTH, B. G.; SMALL, B. C.; GREGORY, D.; KIM, J.; BLACK, S.; JERRETT, A. Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S™ on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. **Aquaculture**, v. 262, p. 302-318, 2007.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 297-304, 2001.

CARNEIRO, P. C. F.; Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 555-560, 2002.

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

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

COLBURN, H. R.; WALKER, A. B.; BERLINSKY, D. L.; NARDI, G. C. Factors affecting survival of Cobia, *Rachycentron canadum*, during simulated transport. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 5, p. 678-683, 2008.

CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3-4, p. 205-223, 2004.

COOKE, S. J.; SUSKI, C. D.; OSTRAND, K. G.; TUFTS, B. L.; WAHL, D. H. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 239, p. 509-529, 2004.

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

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Effects of different stressor agents on gilthead seabream natural cytotoxic activity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 433-441, 2003.

CUNHA, F. E. A.; ROSA, I. L. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 1504-1512, 2006.

DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. **Aquaculture**, v. 233, p. 531-548, 2004

DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.

DURVILLE, P.; COLLET, A. Clove oil used as an anesthetic with juvenile tropical marine fish. **Live Reef Fish Information Bulletin**, v. 9, p. 17-19, 2001.

EMATA, A. C. Live transport of pond-reared milkfish *Chanos chanos* broodstock. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n. 2, p. 279-282, 2000.

EMERSON, K.; RUSSO, R. C.; LUND, R. E.; THURSTON, R. V. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975.

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

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

FENG, G.; ZHUANG, P.; ZHANG, L.; KYNARD, B.; SHI, X.; DUAN, M.; LIU, J.; HUANG, X. Effect of anaesthetics MS-222 and clove oil on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, p. 595-599, 2011.

FINSTAD, B.; IVERSEN, M.; SANDODDEN, R. Stress-reducing methods for releases of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in Norway. **Aquaculture**, v. 222, p. 203-214, 2003.

FOSBERG, J. A.; SUMMERFELT, R. C.; BARTON, B. Physiological and behavioral stress responses of walleyes transported in salt and buffered salt solutions. **North American Journal Aquaculturist**, v. 63, n. 3, p. 191-200, 2001.

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

GHAZILLOU, A.; HASANKANDI, H. S.; CHENARY, F.; NATEGHI, A.; HAGHI, N.; SAHRAEEAN, M. R. The anesthetic efficiency of clove oil in Caspian Salmon, *Salmo trutta caspius* K., smolts in dosage-salinity-pH linked approach. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 4, p. 655-660, 2010.

GOLOMBIESKI, J. I.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B.; DA SILVA, J. H. S. Transporte of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperature, **Aquaculture**, v. 216, p. 95-102, 2003.

GOLOMBIESKI, J. I.; MARCHEZAN, E.; MONTI, M. B.; STORCK, L.; CAMARGO, E. R.; SANTOS, F. M. Qualidade da água no consórcio de peixes com arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1263-1268, 2005.

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

GOMES, L. C.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; CHIPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; URBINATI, E. C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, n. 1, p. 76-84, 2003a.

GOMES, L. C.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 283-290, 2003b.

GOMES, L. C.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; CHIPARI-GOMES, A. R.; ROUBACH, R. Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in closed system. **Brazilian Journal Biology**, v. 66, n. 2A, p. 493-502, 2006a.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R.; COPPATI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Araipama gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, p. 521-528, 2006b.

GONÇALVES, A. F. N.; SANTOS, E. C. C.; FERNANDES, J. B. K.; TAKAHASHI, L. S. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, p. 339-344, 2008.

GONÇALVES, A. F. N.; TAKAHASHI, L. S.; URBINATI, E. C.; BILLER, J. D.; FERNANDES, J. B. K. Transporte de juvenis de curimatá *Prochilodus lineatus* em diferentes densidades. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 2, p. 205-211, 2010.

GONTIJO, A. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, v. 534, p. 165-172, 2003.

GUÉNETTE, S. A.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Eugenol for anaesthesia of African clawed frogs (*Xenopus leavis*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 34, n. 3, p. 164-170, 2007.

HARPER, C., Status of clove oil and eugenol for anesthesia of fish. **Aquaculture Magazine**. v. 29, n. 6, p. 41–42, 2003.

HASAN, M.; BART, A, N.; Effects of capture, loading density and transport stress on the mortality, physiological responses, bacterial density and growth of rohu *Labeo rohita* fingerlings. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 241-248, 2007.

HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. G.; SOARES, C. M.; BOSCOLO, V. B.; GALDIOLOI, E. M. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 21, p. 733-737, 1999.

HIKASA, Y.; TAKASE, K.; OGASAWARA, T.; OGASAWARA, S. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, p. 341-351, 1986.

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

HUMPHREY, J. A.; SEDENSKY, M. M.; MORGAN, P. G. Understanding anesthesia: making genetic sense of the absence of senses. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 10, p. 1241–1249, 2002.

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

INOUE, L. A. K. A. **Respostas do matrinxã (*Brycon cephalus*) a anestésicos e estressores**. 2005. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2005.

INOUE, L. A. K. A.; AFONSO, L. O. B.; IWAMA, G. K.; MORAES, G. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subject to transport. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 2, p. 289-295, 2005.

INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Benzocaína sobre respostas ao estresse do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 3, p. 909-918, 2010.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; McKINELY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R. A. The effect of AQUI-S® sedation on primary, secondary, and tertiary stress responses during salmon smolt, *Salmo salar* L., transport and transfer to sea. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 2, p. 216-225, 2009.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R. A.; FINSTAD, B. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 233-241, 2009.

IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, 2004.

KANE, A. S.; SALIERNO, J. D.; GIPSON, G. T.; MOLTENO, T. C. A.; HUNTER, C. A. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. **Water Research**, v. 38, p. 3993-4001, 2004.

KANG, E. J.; KIM, E. M.; KIM, Y. J.; LIM, S. G.; SIM, D. S.; KIM, Y. H.; PARK, I. S. Effect of lidocaine hydrochloride and clove oil as an anaesthetic on Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii* and oily bitterling, *Acheilognathus koreensis*. **Journal Aquaculture**, v. 18, p. 272-279, 2005.

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

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 286, p.301-308, 2009.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. F.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-STM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.

KING, H. R. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 4, p. 163-168, 2009.

LEFRANÇOIS, C.; CLAIREAUX, G.; MERCIER, C.; AUBIN, J. Effect of density on the routine metabolic expenditure of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 195, n. 3-4, p. 269-277, 2001.

LI, P.; RAY, B.; GATLIN, D. M.; SINK, T.; CHEN, R.; LOCHMANN, R. Effect of handling and transport on cortisol response and nutrient mobilization of golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.40, n. 6, p. 803-809, 2009.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; MELO, D. C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3-4, p. 113-117, 2006.

MAMANGKEY, N. G. F.; ACOSTA-SALMON, H.; SOUTHGATE, P. C. Use of anaesthetics with the silver-lip oyster, *Pinctada maxima* (Jameson). **Aquaculture**, v. 288, p. 280-284, 2009.

MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MATÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, p. 158-178, 2009.

MATSCHE, M. A. Evaluation of tricaine methanesulfonate (MS-222) as a surgical anesthetic for Atlantic Sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. **Journal of the Applied Ichthyology**, v. 27, p. 600-610, 2011.

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

MCDONALD, G.; MILLIGAN, C. L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: **Fish Stress and Health in Aquaculture** (Ed. by Iwama, G. W.; Pickering, A. D.; Sumpter, J. P.; Schrech, C. B.) pp. 119-144. University Press, Cambridge.

MEINERTZ, J. R.; GRESETH, S. L.; SCHREIER, T. M.; BERNARDY, J. A.; GINGERICH, W. H. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S™ at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, v. 254, p. 347-354, 2006.

MEZEAUD, M. M.; MEZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects on stress in fish: some new data with general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p. 201-212, 1977.

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

MOREIRA, A. G. L.; TEIXEIRA, E. G.; CARREIRO, C. R. P.; MOREIRA, R. L. Eficácia do eugenol extraído da planta *Eugenia aromatica* como anestésico para realização de biometrias em adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Science**, v. 32, n. 4, p. 419-423, 2010.

MOREIRA, A. G. L.; TEIXEIRA, E. G.; MOREIRA, R. L.; FARIAS, W. R. L. Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Nilo anestesiados com óleo de cravo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 3, p. 794-804, 2011.

MYLONAS, C. C.; CARDINALETTI, G.; IRINI, S.; POLZONETTI-MAGNI, A. 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**, v. 246, p. 467-481, 2005.

NOMURA, M. **The stress of moving out: physiological and behavioural effects of commercial transport on atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts.** 96 p. The University of British Columbia, 2008.

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

PALIC, D.; HEROLT, D. M.; ANDREASEN, C. B.; MENZEL, B. W.; ROTH, J. A. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**, v. 254, p. 675-685, 2006.

PALMER, L. M.; MENSIGER, A. F. Effect of the anesthetic tricaine (MS-222) on nerve activity in the interior lateral line of the oyster toadfish, *Opsanus tau*. **Journal of Neurophysiology**, v. 92, p. 1034-1041, 2004.

PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, S. T.; SEOL, D. W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2008.

PARK, M. O.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; PARK, I. S. Efficacy and physiological responses of rock beram, *Oplegnathus fasciatus*, to anesthetization with clove oil. **Aquaculture**, v. 287, p. 427-430, 2009a.

PARK, I. S.; PARK, M. O.; HUR, W. J.; KIM, D. S.; CHANG, Y. J.; KIM, Y. J.; PARK, J. Y.; JOHNSON, S. C. Anesthetic effects of lidocaine-hydrochloride on waters parameters in simulated transport experiment of juvenile winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Aquaculture**, v. 294, p. 76-79, 2009b.

PICKERING, A.D. **Introduction: The Concept of Biological Stress**. In: PICKERING, A.D. (Ed.) *Stress and fish*. Academic Press, p.367, 1981.

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

PRINCE, A.; POWELL, C. Clove oil as an anesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 20, n. 4, p. 1029-1032, 2000.

RATHGEBER, B. M.; PATO, M. D.; BOLES, J. A.; SHAND, P. J. Rapid post-mortem glycolysis and delay chilling of turkey carcasses causes alterations to proteins extractability and degradation of breast muscle proteins. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p. 2529-2536, 1999.

RIBAS, L.; FLOS, R.; REIG, L.; MACKENZIE, S.; BARTON, B. A.; TORT, L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v. 269, p. 250-258, 2007.

ROMBOUGH, P. J. Ontogenetic changes in the toxicity and efficacy of the anaesthetic MS222 (tricaine methanesulfonate) in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 463-469, 2007.

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

ROTHWELL, S. E.; BLACK, S. E.; JERRETT, A. R.; FORSTER, M. E. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawtscha*) and snapper (*Pargus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular & Integrative Physiology**, v. 140, n. 3, p. 289-298, 2005.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; VAL, A. L. Safest level of tricaine methasulfonate (MS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã, *Brycon cephalus*. **Acta Amazonica**, n. 31, p. 159-163, 2001

ROUBACH, R.; GOMES, L. C. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L.; VAL, A. L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1056-1061, 2005.

SEIDELIN, M.; MADSEN, S. S.; BYRIALSEN, A.; KRISTIANSEN, K. Effects of insulin-like growth factor-I and cortisol on Na⁺, K⁺-ATPase expression in osmoregulatory tissues of brown trout (*Salmo trutta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 331-342, 1999.

SEOL, D. W.; LEE, J.; IM, S. Y.; PARK, I. S. Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). **Aquaculture Research**, v. 38, p. 45-49, 2007.

SHARP, N. J.; DIGGLES, B. K.; POORTENAAR, C. W.; WILLIS, T. J. Efficacy of AQUI-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. **Aquaculture**, v. 236, p. 67-83, 2004.

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

SLADKY, K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A.; Comparative efficacy of tricaine methanosulfonate and clove oil for use anesthetics in red pacu (*Piaractus brachpomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 337-342, 2001.

SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparasion of plasma cortisol responses tricaine methasulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p. 177-185, 2003.

SMALL, B, C. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. **Journal Fish Biology**, v.64, n. 2, p.589-596, 2004.

TANCK, M. W. T.; CLAES, T.; BOVEHNIUS, H.; KOMEN, J. Exploring the genetic background of stress using isogenetic progenies of common carp selected for high or low stress-related cortisol response. **Aquaculture**, v. 204, p. 419-434, 2002.

TSANTILAS, H.; GALATOS, A. D.; ATHANASSOPOULOU, F.; PRASSINOS, N. N.; KOUSOULAKI, K. 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**, v. 253, p. 64-70, 2006.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; LANDINES, M. A. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densites. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004.

VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V.; GROCH, L.; NEPEJHALOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinarni Medicina**, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005.

VELISEK, J.; STARA, A.; LI, Z. H.; SILOVSKA, S.; TUREK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidadtive stress biomarkers in raibow trout. **Aquaculture**, v. 310, p. 369-375, 2011.

VERA, L. M.; RÓS-SANCHES, G.; GARCÍA-MATEOS, G.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. MS-222 toxicity in juvenile seabream correlates with diurnal activity, as measured by a novel video-tracking method. **Aquaculture**, v. 307, p. 29-34, 2010.

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

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

VOLPATO, G. L. Considerações metodológicas sobre o teste de preferência na avaliação do bem-estar em peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 53-61, 2007.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.

WAGNER, G. N.; SINGER, T. D.; MCKINLEY, R. S.; The ability of clove oil and MS222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1139-1146, 2003.

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

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

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

YOUNG, M. J. The efficacy of the aquatic anaesthetic AQUI-S[®] for anaesthesia of a small freshwater fish, *Melanotaenia australis*. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 1888-1894, 2009.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v. 295, p. 52-59, 2009.