

ALCINÉA MALZETE CORREIA

Uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia* e *Ocimum basilicum* como anestésicos e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Aquicultura para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Mônica Yumi Tsuzuki

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Correia, Alcinéa Malzete

Uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*,
Melaleuca alternifolia e *Ocimum basilicum* como anestésicos
e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii* /
Alcinéa Malzete Correia ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki
- Florianópolis, SC, 2015.

61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Basilicão. 3. Cravo-da-índia. 4.
Piscicultura Ornamental Marinha. 5. Pomacentridae. I. ,
Mônica Yumi Tsuzuki. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III.
Título.

Uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia* e *Ocimum basilicum* como anestésicos e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*

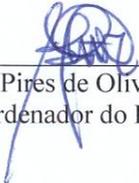
Por

ALCINÉA MALZETE CORREIA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



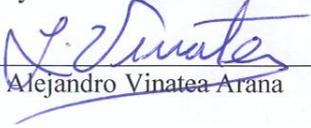
Dra. Mônica Yumi Tsuzuki – Orientadora



Dr. Evoy Zaniboni Filho



Dr. Levy de Carvalho Gomes



Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana

*À amada Nicolle Correia, luz da minha vida,
e aos meus queridos peixes.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Mônica Yumi Tsuzuki pela oportunidade de realizar este trabalho e orientação.

A toda equipe do LAPOM pelo apoio e alto-astrol que me faziam ir trabalhar sempre sorrindo. Em especial à “Co-Orientadora” Ana Sílvia Pedrazzani pelos ensinamentos, participação e correção e; ao Raoani Cruz de Mendonça pelos peixes, incentivos e, principalmente, pela paz que irradia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura pelos conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários da UFSC Carlito Aloísio Klunk, Jussara Orige Bach Gonçalves, Jeff Sílvio de Oliveira, Salete Sassá, Valmor Rosa e Silva e pessoal da Biblioteca Setorial por todos os cafezinhos e ajudinhas.

À banca examinadora pelas contribuições.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus anjos Pierre, Samuel, Dr. Alberto, Avó Maria, minha querida Mãe e Cia. Celestial Ltda. pela proteção e “ajudinhas do além” em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos Zaqueu Ferreira Felisberto, Augusto Sardá Vieira, Bruno Leleco, Marcos Antônio Adriano, Paulo Cesar Rosa e Cláudia Tolentino pelos abraços revigorantes, material de estudo e palavras de incentivo.

Ao meu querido pai, Plácido Gustavo Correia, pelo “patrocínio” e à minha querida “mãedrastra”, Dona Alda, por me lembrar o que é receber carinho materno.

À minha amada Nicolli Correia, por me ofertar a mão em momentos difíceis, por todo carinho, companheirismo, atenção, doçura, cumplicidade, incentivo, compreensão, amor e, por me dar uma verdadeira lição de vida todos os dias. Eu te amo, minha filhota linda!

Por último, porém em especial, aos peixinhos do LAPOM e da “lagoa ao lado” pela tranquilidade e alegria que me transmitiam e por permitirem a realização deste trabalho.

A todos citados, meu respeito, admiração e sinceros agradecimentos.

Jamais desistirei dos meus sonhos, pois a cada amanhecer Deus me presentia com uma nova oportunidade de lutar e ser feliz.

(adaptado; autor desconhecido)

RESUMO

O presente trabalho avaliou os efeitos anestésicos e analgésicos dos óleos essenciais (OE) de cravo *Eugenia caryophyllata*, melaleuca *Melaleuca alternifolia* e manjericão *Ocimum basilicum* durante o manejo de peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*. Animais com $1,03 \pm 0,50$ g (média \pm desvio padrão) de peso e $3,70 \pm 0,75$ cm de comprimento total foram submetidos às concentrações de 40, 50, 60, 70 e $80 \mu\text{l L}^{-1}$ de OE de cravo, 150, 200, 250, 300 e $350 \mu\text{l L}^{-1}$ de manjericão e 200, 300, 400, 500 e $600 \mu\text{l L}^{-1}$ de melaleuca (n=10/concentração), previamente definidas em testes pilotos. Também foram realizados tratamentos controle (apenas água marinha) e branco (apenas etanol na maior concentração utilizada para diluir os OE adicionado à água marinha). Após atingirem o estágio anestésico VI (ausência de movimentos natatórios e mínimo movimento opercular), os peixes foram submetidos a procedimento de biometria e teste de sensibilidade (punção nos lábios). Em seguida foram transferidos para recuperação em água sem anestésico contendo aeração. Os tempos de indução necessários para atingir cada estágio anestésico, para procedera biometria e recuperação anestésica foram registrados. Os animais foram observados por 72 horas após os procedimentos quanto à ingestão de alimento e mortalidade. Todos os OE provocaram efeitos anestésicos e analgésicos em *A. clarkii*. Apenas em tratamentos com OE de manjericão foram observados mortalidade e efeitos colaterais indesejáveis (contrações musculares involuntárias) em 12% e 100%, respectivamente. As menores concentrações que promoveram tempos adequados de indução e recuperação, maior efeito analgésico sem causar mortalidade foram 50, 250 e $500 \mu\text{l L}^{-1}$ de OE de cravo, manjericão e melaleuca, respectivamente.

Palavras-chave: Aquicultura. Basilicão. Cravo-da-índia. Piscicultura ornamental marinha. Pomacentridae.

ABSTRACT

This study evaluated the anesthetic and analgesic effects of essential oils (EO) of clove *Eugenia caryophyllata*, tea tree *Melaleuca alternifolia* and basil *Ocimum basilicum* during the handling of juveniles (1.0 g; 3.70 cm) of the clownfish *Amphiprion clarkii*. Animals were subjected to concentrations of 40, 50, 60, 70, and 80 $\mu\text{l L}^{-1}$ of the EO of clove, 150, 200, 250, 300 and 350 $\mu\text{l L}^{-1}$ of basil and 200, 300, 400, 500 and 600 $\mu\text{l L}^{-1}$ of tea tree ($n = 10$ / concentration), previously set in pilot tests. Control (only seawater) and Complementary (only ethanol in the highest concentration used to dilute the EO added to seawater) treatments were also carried out. After reaching the anesthetic stage VI (no swimming and minimal opercular movement), fish were subjected to biometrics procedures and to a sensibility test (puncture on the lip). They were then transferred to recovery water without anesthetic containing aeration. The induction times required to achieve each anesthetic stage, to proceed biometry and to recover were recorded. The animals were observed for 72 hours after these procedures to monitor feeding and mortality. All EO caused anesthetic and analgesic effects in *A. clarkii*. Only in treatment with basil, mortalities and undesirable side effects were observed (involuntary muscle contractions) by 12% and 100%, respectively. The lowest concentrations that promoted appropriate induction and recovery times, greater analgesic effect without causing mortalities were 50, 250 and 500 $\mu\text{l L}^{-1}$ of clove, basil and tea tree EO, respectively.

Keywords: Aquaculture. Basil oil. Clove oil. Marine ornamental fish production. Pomacentridae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tempos (em segundos) de indução anestésica em *A. clarkii* em cada concentração dos OE, sendo (A) cravo *E. caryophyllata*, (B) manjerição *O. basilicum* e (C) melaleuca *M. alternifolia*..... 38

Figura 2. Tempos (em segundos) para recuperação dos *A. clarkii* em cada concentração dos OE, sendo (A) cravo *E. caryophyllata* (P = 0,0270), (B) manjerição *O. basilicum* e (C) melaleuca *M. alternifolia*. 41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Comportamentos característicos de cada estágio anestésicos em peixes 35
- Tabela 2.** Percentagem de animais que sofreram analgesia; medianas dos tempos (em segundos) necessários para realização de biometria e mortalidade ocorrida durante e após exposição a cada concentração dos OE de cravo *E. caryophyllata*, manjerição *O. basilicum* e melaleuca *M. alternifolia* e parâmetros de qualidade da água..... 39
- Tabela 3.** Variáveis estudadas pela análise de regressão após o uso de óleos essenciais de cravo *E. caryophyllata*, manjerição *O. basilicum* e melaleuca *M. alternifolia* em *A. clarkii* (r = coeficiente de correlação; p = nível de significância e; r^2 = coeficiente de determinação) 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	- Acetilcolinesterase
LAPOM	- Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos
NH ₃	- Amônia tóxica
NO ₂	- Nitrito
NTU	- Unidades Nefelométricas de Turbidez
OE	- Óleo(s) Essencial(is)
pH	- Potencial Hidrogeniônico
SNC	- Sistema Nervoso Central
TTO	- <i>Tea Tree Oil</i>
UFSC	- Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	23
1.1	OBJETIVOS	30
1.1.1	Objetivo Geral.....	30
1.1.2	Objetivos Específicos.....	30
2	CAPÍTULO ÚNICO - Uso dos óleos essenciais <i>Eugenia caryophyllata</i>, <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Ocimum basilicum</i> como anestésicos e analgésicos em peixes palhaços <i>Amphiprion clarkii</i>	31
2.1	RESUMO.....	31
2.2	INTRODUÇÃO	32
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.3.1	Manutenção dos Animais	34
2.3.2	Óleos Essenciais.....	34
2.3.3	Delineamento Experimental	34
2.3.4	Análises Estatísticas	36
2.4	RESULTADOS	37
2.5	DISCUSSÃO	42
2.6	CONCLUSÃO.....	44
2.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	51
	ANEXO A – Laudo Técnico do Óleo Essencial de Cravo	57
	ANEXO B – Laudo Técnico do Óleo Essencial de Manjeriço	59
	ANEXO A – Laudo Técnico do Óleo Essencial de Melaleuca	61

1. INTRODUÇÃO GERAL

Mercado mundial de aquariorfilia marinha

O mercado internacional de ornamentais marinhos teve origem entre as décadas de 1920 e 1930 no Sri Lanka, em pequena escala de importação (EKARATHNE, 2004), expandindo gradativamente a partir da década de 1950, quando negociantes começaram a exportar peixes por via aérea. Segundo Herath & Wijewardene (2014), a exportação de peixes ornamentais é uma atividade muito lucrativa e, ao todo, 45 países encontram-se envolvidos nessa indústria, dos quais a Indonésia e as Filipinas são os principais exportadores (WOOD, 2001). Os EUA, a União Europeia e o Japão, por outro lado, são os principais importadores (WOOD, 2001; WABNITZ *et al.*, 2003).

Estima-se que entre 1,5 a 2 milhões de pessoas tenham aquários marinhos, mantendo um comércio global que movimenta cerca de US\$ 200 a 330 milhões por ano. O problema dessa atividade multimilionária é que ao contrário do comércio de espécies de peixes ornamentais de água doce, onde 90% dos animais são provenientes da aquicultura, a grande maioria das 1471 espécies marinhas mundialmente comercializadas para fins ornamentais são extraídas do seu habitat natural (WABNITZ *et al.*, 2003). A intensa pressão da pesca tem mostrado um considerável impacto sobre as populações das espécies-alvo, gerando sobreexploração de algumas espécies, colocando-as em listas de animais ameaçados de extinção (KOLDEWEY & MARTIN-SMITH, 2010; MADDUPPA *et al.*, 2014).

Dessa forma, apesar da coleta destes animais no ambiente natural ser uma fonte potencial de renda para as comunidades que vivem no entorno de recifes de coral, a atividade pesqueira para fins ornamentais tem sido fortemente criticada pela utilização de técnicas de coleta insustentáveis, (WABNITZ *et al.*, 2003). No entanto, considerando a importância de peixes de recifes de corais para o mercado da aquariorfilia e buscando reduzir a sobreexploração dos estoques selvagens, grandes esforços tem sido feitos para cultivar as espécies de interesse em cativeiro (JOHNSTON *et al.*, 2003).

Aquicultura de ornamentais marinhos

Além de ser uma ferramenta alternativa para diminuição do extrativismo, a criação de peixes ornamentais marinhos em sistema de

recirculação de água apresenta grandes vantagens em comparação com a piscicultura de corte (KOLDEWEY & MARTIN-SMITH, 2010). Um dos fatores favoráveis é o cultivo ornamental não exigir ocupação de grandes áreas, podendo ser realizado em sistema de aquários verticalizados e, inclusive, ser localizado em áreas urbanas, próximas ao grande mercado consumidor. Ademais, segundo Blancheton (2000), o reaproveitamento da água através do uso de sistema de filtragem, atende o conceito de uma atividade responsável e ecologicamente correta, garantindo economia de água e baixo impacto ambiental.

Outrossim, os peixes ornamentais marinhos também possuem um alto valor de mercado, pois os animais são comercializados unitariamente, conferindo um preço por quilo superior ao da piscicultura de corte. Além disso, a complexidade do aquarismo marinho eleva ainda mais o valor unitário dos peixes em relação aos ornamentais de água doce. Essas características acima citadas favorecem a geração de trabalho e renda para pequenos empreendedores, aproveitando modestas áreas e mão-de-obra familiar para a geração de produtos bem valorizados (WABNITZ *et al.*, 2003; KOLDEWEY & MARTIN-SMITH, 2010). Todavia, antes de se iniciar na atividade, alguns fatores devem ser considerados, como demanda de mercado, valor de comercialização, aspectos zootécnicos e tecnologia de produção disponível para avaliar o potencial para aquicultura comercial de cada espécie (KODAMA, 2010).

Porém, apesar do cultivo de ornamentais marinhos ser uma atividade ambiental, econômica e socialmente sustentável, segundo Wittenrich (2007), apenas aproximadamente 100 espécies de peixes marinhos comercializados para fins ornamentais são produzidas em cativeiro. Entre essas espécies cultivadas, encontram-se os peixes-palhaços, cuja desova em cativeiro é conhecida desde os anos de 1900, tendo sua reprodução comercial estabelecida desde os 1950.

Os peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*

Os peixes-palhaços, pertencentes à família Pomacentridae (Teleostei: Perciformes), são também conhecidos como peixe-anêmona devido à simbiose obrigatória, quando em ambiente natural, com algumas espécies de anêmonas (WABNITZ *et al.*, 2003; SHUMAN *et al.*, 2005; THORNHILL, 2012). Essa relação influencia a distribuição geográfica dos peixes-palhaços e sua população (WILKERSON, 2003) e, os tornam intensamente susceptíveis à sobrepesca pela facilidade de coleta (EDWARDS E SHEPHERD, 1992).

Toda a família, particularmente as espécies do gênero *Amphiprion*, representa o mais importante grupo de espécies marinhas em aquários (JOHNSTON, 2003) dominando 47% das exportações de ornamentais (WABNITZ *et al.*, 2003). Esse prestígio deve-se principalmente devido à sua variada coloração (PIRARAT *et al.*, 2011), facilidade de reprodução em cativeiro (WABNITZ *et al.*, 2003) e a existência de pacotes tecnológicos de cultivo (ZIEMANN, 2001).

O *A. clarkii* é uma espécie não migratória que se distribui ampla e naturalmente por todo o Oceano Indo-Pacífico (PINSKY, MONTES-JR. & PALUMBI, 2010), habitando desde as ilhas da Micronésia e Melanésia, no Pacífico Ocidental ao Golfo Pérsico, e da Austrália até o Japão (THORNHILL, 2012). A espécie é bem requisitada no mercado mundial de aquarofilia marinha (YE *et al.*, 2011; THORNHILL, 2012), sendo seu tamanho comercial entre 3 e 4 cm. Conhecido como peixe-palhaço-de-cauda-amarela, possui coloração altamente variável, podendo ser amarela, marrom ou até mesmo próxima ao negro, apresentando de duas a três faixas de coloração branca ou acinzentada perpendiculares ao corpo. Quando as fêmeas amadurecem sexualmente, a nadadeira caudal muda da coloração amarela para a branca (WILKERSON, 2003).

Os peixes dessa espécie são hermafroditas protândricos e monogâmicos, vivendo em grupos sociais com dominância baseada no tamanho corporal, sendo a fêmea o maior animal do grupo e o macho o segundo maior, enquanto os demais peixes permanecem imaturos. Na ocasião de morte ou remoção desta fêmea, o macho do grupo sofre inversão sexual para ocupar a posição dominante (KOBAYASHI *et al.*, 2010; THORNHILL, 2012), enquanto que um dos peixes imaturos do grupo torna-se macho.

Possuem frequência regular entre as desovas, com fecundação e desenvolvimento ocorrendo no meio externo. Idade e nutrição dos reprodutores influenciam na taxa de fecundidade (WILKERSON, 2003), podendo gerar em torno de 1500 ovos. O período de incubação é rápido, entre 6 e 8 dias (WITTENRICH, 2007), sendo os machos responsáveis por cuidar dos ovos durante esse tempo, promovendo vigorosa oxigenação, defendendo-os de possíveis predadores e retirando os mortos (WILKERSON, 2003; THORNHILL, 2012). As larvas apresentam comportamento voraz iniciando a alimentação exógena logo após eclosão e, os peixes são considerados resistentes e crescem de forma rápida assim que ultrapassado o crítico processo de metamorfose (WILKERSON, 2003).

Por ainda ser uma espécie fortemente explorada no ambiente natural, o declínio de *A. clarkii* em seu habitat gerou a criação de áreas protegidas, com restrições de coleta (THORNHILL, 2012). Por outro lado, felizmente o cultivo da espécie vem sendo realizado com sucesso (YE *et al.*, 2011), o que representa uma alternativa para suprir a demanda de mercado.

Estresse e dor durante o manejo de peixes

Durante o cultivo e a comercialização, os peixes são submetidos a procedimentos de manejo capazes de provocar alterações fisiológicas conhecidas como resposta ao estresse, o que diretamente influencia o bem-estar dos animais (BARTON & IWANA, 1991; COOKE & SNEDDON, 2007; GULLIAN & VILLANUEVA, 2009; BERGQVIST & GUNNARSSON, 2013). Além disso, há um crescente reconhecimento de que os peixes podem experimentar conscientemente medo, dor e sofrimento (CHANDROO *et al.*, 2004; COOKE & SNEDDON, 2007; ROSS & ROSS, 2008).

Investigações recentes relataram a presença de diferentes tipos de neuroreceptores, incluindo nociceptores, na cabeça e, em especial, na boca de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (COOKE & SNEDDON, 2007). As fibras nociceptoras do tipo C e A-delta encontradas sobre a cabeça do peixe, ao redor dos lábios e no opérculo (SNEDDON *et al.*, 2003) são idênticas às dos mamíferos (SNEDDON, 2003a), o que sugere que os peixes também sejam capazes de sentir dor (SNEDDON, 2003b), uma resposta complexa e subjetiva, envolvendo tanto a detecção e a transdução de estímulos nocivos, quanto o processamento emocional e cognitivo desse estímulo dentro do cérebro (ROSS & ROSS, 2008). Sneddon (2003b) relata a ocorrência de consequências comportamentais e fisiológicas adversas em truta arco-íris como resposta a evento nocivo, potencialmente doloroso.

Qualquer processo que envolva métodos invasivos, que vão desde formas relativamente simples de marcação usando agulhas até incisões, suturas ou cirurgias internas, pode proporcionar algum grau de dor nos peixes (ROSS & ROSS, 2008), o que caracteriza desconforto (SNEDDON, 2012). Assim, medidas devem ser tomadas para atenuar qualquer sofrimento que eventualmente venha a ser causado em manipulações durante o cultivo. Logo, substâncias sedativas e analgésicas têm sido utilizadas para facilitar o manejo, preservar o bem-estar animal e minimizar os efeitos deletérios do estresse, prevenindo injúrias físicas e bloqueando a transmissão nociceptiva, impedindo a

sensação de dor durante os procedimentos (WAGNER, ARNDT & HILTON, 2002; INOUE, SANTOS-NETO & MORAES, 2003; SMALL, 2003; FAÇANHA & GOMES, 2005; ROSS & ROSS, 2008; GULLIAN & VILLANUEVA, 2009; SNEDDON, 2012).

Uso de anestésicos e analgésicos na piscicultura

De modo geral, a escolha de um anestésico para uso em piscicultura depende da sua eficácia na indução e recuperação dos animais (MARKING & MEYER, 1985; ROSS & ROSS, 2008). Aspectos econômicos, considerações legais, características de disponibilidade no mercado, além de possíveis efeitos colaterais tanto aos peixes, quanto aos humanos e ao ambiente, também devem ser avaliados como critérios para a escolha do produto (MARKING & MEYER, 1985).

Diversos produtos sintéticos tais como a triclaína metano sulfonato (MS-222), sulfato de quinaldina, benzocaína e 2-fenoxietanol são amplamente utilizados para anestésiar peixes (GOMES *et al.*, 2001). No entanto, algumas dessas substâncias podem apresentar diversos inconvenientes, tais como a perda de muco, irritação nas brânquias e danos nas córneas (INOUE *et al.*, 2003) e, efeito carcinogênico (PIRHONEN & SCHRECK, 2003). Ademais, alguns químicos ainda podem ser de uso limitado ou proibido (IVERSEN *et al.*, 2003), bem como de difícil obtenção ou custo elevado em alguns países (ROUBACH & GOMES, 2001). Como alternativas ao uso de produtos sintéticos, os óleos essenciais (OE) têm sido estudados para esse fim.

Óleos essenciais com potencial para anestesia e analgesia em *A. clarkii*

Há uma crescente demanda por uso de produtos anestésicos de baixo custo, fácil aquisição e que ofereçam segurança ao manipulador e ao meio ambiente. Alguns OE derivados de plantas têm se mostrado uma alternativa viável para reduzir o estresse em peixes durante procedimentos como captura e manuseio (SILVA *et al.*, 2013). Os OE de *Eugenia caryophyllata* (WEBER *et al.*, 2009; PAWAR *et al.*, 2011), *Lippia alba* (CUNHA *et al.*, 2011), *Cinnamomum camphora*, *Mentha arvensis* (PEDRAZZANI & OSTRENSKY 2014), *Melaleuca alternifolia* (HAJEK 2011), *Ocimum gratissimum* (BENOVIT, GRESSLER & SILVA 2012), *Hesperozygis ringens* e *Ocotea acutifolia*

(SILVA *et al.*, 2013) são exemplos de substâncias naturais com ação anestésica em peixes.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas contidas em vários órgãos das plantas (TAVARES, MOMENTÉ & NASCIMENTO, 2011). A qualidade do produto é afetada por vários fatores ambientais, como clima, solo, regiões geográficas, duração do dia e da noite, órgão de onde foi extraído o óleo (caules, flores, folhas, raízes), fase de desenvolvimento da planta na época da colheita, condição de secagem, tempo de armazenamento, entre outros fatores (KAMADA *et al.*, 1999; CASTRO *et al.*, 2004; LUZ *et al.*, 2009; COUIC-MARINIER & LOBSTEIN, 2013). Assim, faz-se necessário utilizar óleos produzidos em laboratórios que possuem credibilidade e que forneçam laudos (Anexos A, B e C) indicando as concentrações de cada componente de seus produtos.

O óleo de cravo é um conhecido depressor do sistema nervoso central (SNC) de peixes, atuando como anestésico e analgésico (ROSS & ROSS, 2008). Esse óleo é extraído da *Eugenia caryophyllata* (sinônimos: *E. caryophyllus* e *Syzygium aromaticum*), pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como cravo-da-índia, uma árvore aromática nativa da Indonésia (FRUTUOSO *et al.*, 2013). Possui como principal componente o eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), substância segura para peixes, por não apresentar efeitos colaterais (SOTO & BURHANUDDIN, 1995; WAGNER *et al.*, 2002; ROSS & ROSS, 2008) quando em concentrações e metodologias indicadas para espécie específica.

Outra espécie também pertencente à família Myrtaceae, cujo OE apresenta potencial para uso em peixes é a *Melaleuca alternifolia*, arbórea nativa da Austrália, popularmente conhecida como “tea tree” (árvore do chá). É vastamente utilizada pela medicina tradicional devido às propriedades antifúngicas, bactericidas e anti-inflamatórias de seu principal componente, o terpinen-4-ol (CARSON *et al.*, 2006), além de apresentar propriedades anestésicas e analgésicas. Apesar de ser utilizado em pisciculturas ornamentais como medicamento cicatrizante de origem natural, o conhecimento sobre anestesia em peixes ainda são escassos (HAJEK, 2011).

O *Ocimum basilicum*, pertencente à família Lamiaceae, popularmente conhecido como manjerição ou basilicão, é outra espécie de planta que possui potencial para uso como anestésico em peixes, pois além de ser amplamente cultivado (MACHADO *et al.*, 2011), esse vegetal possui efeito analgésico em humanos (GRANDI *et al.*, 1989;

ARVIGO & BALICK, 1993; BILAL *et al.*, 2012), além de proporcionar anestesia local e possuir propriedades depressoras do SNC (BILAL *et al.*, 2012; PANDEY, SINGH & TRIPATHI, 2014).

Como se desconhece existência de documento científico sobre o uso de OE de manjeriço como anestésico ou analgésico em peixes, assim como também não há estudos conclusivos sobre o uso de óleo de cravo e de melaleuca em *A. clarkii*, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência de diferentes concentrações de OE dessas três espécies vegetais tanto para anestesia, quanto para analgesia do peixe-palhaço-de-cauda-amarela.

O artigo será submetido à publicação no periódico *Aquaculture Research* (ISSN:1365-2109), tendo sido redigido segundo as normas da revista científica, porém ora apresentado em Língua Portuguesa.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência anestésica e analgésica de diferentes concentrações de óleo essencial de cravo *E. caryophyllata*, manjerição *O. basilicum* e melaleuca *M. alternifolia* sobre juvenis de peixe palhaço *A. clarkii*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a eficiência anestésica das diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo, melaleuca e manjerição sobre os juvenis de *A. clarkii* em relação ao tempo de indução e de recuperação;
- ✓ Determinar a eficiência de diferentes concentrações dos OE de cravo, manjerição e melaleuca para analgesia em *A. clarkii*;
- ✓ Verificar mortalidade dos peixes após exposição aos produtos anestésicos.

2 CAPÍTULO ÚNICO

Uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia* e *Ocimum basilicum* como anestésicos e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*

Alcinéa M Correia, Ana S Pedrazzani & Mônica Y Tsuzuki

Integrantes do Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos,
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

E-mail: neacorreia@yahoo.fr

2.1 RESUMO

O presente trabalho avaliou os efeitos anestésico e analgésico dos óleos essenciais (OE) de cravo *Eugenia caryophyllata*, melaleuca *Melaleuca alternifolia* e manjericão *Ocimum basilicum* durante o manejo de peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*. Animais com $1,03 \pm 0,50$ g (média \pm desvio padrão) de peso e $3,70 \pm 0,75$ cm de comprimento total foram submetidos às concentrações de 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OE de cravo, 150, 200, 250, 300 e 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ de manjericão e 200, 300, 400, 500 e 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ de melaleuca ($n=10/\text{concentração}$), previamente definidas em testes pilotos. Também foram realizados tratamentos controle (apenas água marinha) e branco (apenas etanol na maior concentração utilizada para diluir os OE adicionado à água marinha). Após atingirem o estágio anestésico VI (ausência de movimentos natatórios e mínimo movimento opercular), os peixes foram submetidos a procedimento de biometria e teste de sensibilidade (punção nos lábios). Em seguida foram transferidos para recuperação em água sem anestésico contendo aeração. Os tempos de indução necessários para atingir cada estágio anestésico, para proceder a biometria e recuperação anestésica foram registrados. Os animais foram observados por 72 horas após os procedimentos quanto à ingestão de alimento e mortalidade. Todos os OE provocaram efeitos anestésicos e analgésicos em *A. clarkii*. Apenas em tratamentos com OE de manjericão foram observados mortalidade e efeitos colaterais indesejáveis (contrações musculares involuntárias) em 12% e 100%, respectivamente. As menores concentrações que promoveram tempos adequados de indução e recuperação, maior efeito analgésico, sem causar mortalidade foram 50, 250 e 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OE de cravo, manjericão e melaleuca, respectivamente.

Palavras-chave: Basilicão, cravo-da-índia, *Eugenia caryophyllus*, piscicultura ornamental marinha, Pomacentridae, *Syzygium aromaticum*.

2.2 INTRODUÇÃO

A família Pomacentridae (Teleostei: Perciformes), particularmente as espécies do gênero *Amphiprion*, representa o mais importante grupo de peixes marinhos em aquários (Johnston, Kaiser, Hecht & Oellermann 2003). O peixe-palhaço *Amphiprion clarkii* vive em associação com diversas anêmonas, sendo o peixe recifal mais amplamente distribuído, encontrando-se naturalmente em todo o Oceano Indo-Pacífico (Pinsky, Montes-Jr. & Palumbi 2010). É um dos importantes ícones no mercado de animais recifais para ornamentação e, sua larvicultura tem sido realizada (Ye, Yang, Zhu, Liu, Lin, & Wu 2011). Entretanto, são escassos os trabalhos que lidam com métodos mais adequados para o manejo da espécie.

É sabido que durante o cultivo e a comercialização, os peixes são submetidos a procedimentos de manejo capazes de provocar alterações fisiológicas, como resposta ao estresse, o que diretamente influencia o bem-estar dos animais (Barton & Iwana 1991; Cooke & Sneddon 2007; Gullian & Villanueva 2009; Bergqvist & Gunnarsson 2013). Além disso, há um crescente reconhecimento de que os peixes podem experimentar conscientemente medo, dor e sofrimento (Chandroo, Duncan & Moccia 2004; Cooke & Sneddon 2007; Ross & Ross 2008; Sneddon 2012). A fim de facilitar o manejo, prevenir injúrias físicas e dor durante os procedimentos, preservando o bem-estar animal, minimizando os efeitos deletérios do estresse e mortalidades, substâncias sedativas e analgésicas têm sido utilizadas (Wagner, Arndt & Hilton 2002; Small 2003; Façanha & Gomes 2005; Inoue, Santos-Neto & Moraes 2003; Ross & Ross 2008; Gullian & Villanueva 2009).

Diversos produtos sintéticos, tais como a tricaina metanosulfonato (MS-222), sulfato de quinaldina, benzocaína e 2-fenoxietanol são amplamente utilizados para anestesiarem peixes (Gomes, Chippari-Gomes, Lopes, Roubach & Araujo-Lima 2001; Inoue *et al.* 2003). No entanto, diversos inconvenientes, tais como a perda de muco, irritação nas brânquias e danos nas córneas podem ser observados (Inoue *et al.* 2003), além de poderem ser carcinogênicos (Pirhonen & Schreck 2003). Ademais, podem ser de uso limitado ou proibido, de difícil obtenção e custo elevado em alguns países (Roubach & Gomes 2001; Iversen, Finstad, McKinley & Eliassen 2003).

Por outro lado, há uma crescente demanda por uso de produtos anestésicos de baixo custo, fácil aquisição e que ofereça segurança ao manipulador e ao meio ambiente. Alguns óleos essenciais (OE) derivados de plantas tem se mostrado uma alternativa viável para reduzir o estresse em peixes produzido durante procedimentos como captura e manuseio anestesia de peixes (Silva, Silva, Garlet, Cunha, Mallmann, Baldisserotto & Heinzmann 2013). Os OE de *Eugenia caryophyllata* (Weber, Peleteiro, García-Martín & Aldegunde 2009; Pawar, Sanaye, Sreepada, Harish, Suryavanshi, Tanu & Ansari 2011), *Lippia alba* (Cunha, Silva, Delunardo, Benovit, Gomes, Heinzmann & Baldisserotto, 2011), *Cinnamomum camphora*, *Mentha arvensis* (Pedrazzani & Ostrensky 2014), *Melaleuca alternifolia* (Hajek 2011), *Ocimum gratissimum* (Benovit, Gressler & Silva 2012), *Hesperozygis ringens* e *Ocotea acutifolia* (Silva *et al.* 2013) são exemplos de substâncias naturais com ação anestésica em peixes.

O óleo de cravo, extraído da *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae), é um conhecido depressor do sistema nervoso central (SNC) de peixes, atuando como anestésico e analgésico. Possui como principal componente o eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), substância segura para peixes, por não apresentar efeitos colaterais (Soto & Burhanuddin 1995; Wagner *et al.* 2002; Ross & Ross 2008).

A *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), é conhecida pelas ações antifúngicas, bactericidas e anti-inflamatórias de seu principal componente, o terpinen-4-ol (Carson, Hammer & Riley 2006), além de apresentar propriedades anestésicas e analgésicas. Produto comercial a base de OE de melaleuca é comumente utilizado como medicamento cicatrizante em peixes ornamentais. Entretanto, estudos sobre sua eficiência anestésica em peixes é escasso (Hajek 2011).

Outra espécie de planta que possui potencial para uso como anestésico em peixes é *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), popularmente conhecida como manjerição ou basilicão, pois possui efeito analgésico (Bilal, Jahan, Ahmed, Bilal, Habib & Hajra 2012) sendo utilizado para aliviar cólicas menstruais (Arvigo & Balick 1993) e demais dores no corpo (Grandi, Trindade, Pinto, Ferreira & Catella 1989), além de proporcionar anestesia local e possuir propriedades depressoras do SNC (Bilal *et al.* 2012; Pandey, Singh & Tripathi 2014). Todavia, não há qualquer conhecimento científico sobre o seu uso como anestésico ou analgésico em peixes, assim como também não há estudos conclusivos sobre o uso de óleo de cravo e de melaleuca em *A. clarkii*.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente a eficiência de diferentes concentrações de OE de

cravo, melaleuca e manjeriço tanto para anestesia, quanto para analgesia do peixe-palhaço *A. clarkii*.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Peixes e Ornamental Marinhos (LAPOM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis, Estado de Santa Catarina, Brasil.

2.3.1 Manutenção dos Animais

Foram utilizados 170 *A. clarkii* ($1,03 \pm 0,50$ g de peso e $3,70 \pm 0,75$ cm de comprimento total; média \pm desvio padrão) cultivados a uma densidade de $0,5$ peixe L^{-1} em sistema aberto com aquecimento ($25,5 \pm 1,5$ °C) e aeração constante, na salinidade de 35 ± 1 g L^{-1} (médias \pm desvio padrão). Os peixes eram alimentados até a saciedade aparente duas vezes ao dia com ração comercial para peixes ornamentais marinhos (Inve, Bélgica), porém foram privados de alimento 24 horas antes dos experimentos.

2.3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais foram adquiridos da Ferquima Indústria e Comércio LTDA, sendo as composições dos produtos informadas pela empresa através de laudos técnicos (cravo *E. caryophyllata*: Eugenol = 86%; melaleuca *M. alternifolia*: Terpinen-4-ol = 42% e Gammaterpinene = 22%; manjeriço *O. basilicum*: Metil Chavicol = 84%).

Soluções-estoque foram preparadas diluindo cada óleo essencial em álcool etílico 92,8%, na proporção de 1:10. Cada solução foi armazenada em frascos de vidro âmbar devidamente identificados, ficando esses protegidos de umidade, fontes de luz e de calor.

2.3.3 Delineamento experimental

Os peixes foram submetidos a cinco diferentes concentrações de cada OE ($n=10$ /concentração), previamente definidas em testes pilotos, sendo 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu L L^{-1}$ de cravo, 150, 200, 250, 300 e 350 $\mu L L^{-1}$ de manjeriço e, 200, 300, 400, 500 e 600 $\mu L L^{-1}$ de melaleuca. Ainda foram avaliados um grupo branco, no qual foi acrescentado à água apenas 5400 $\mu L L^{-1}$ de etanol (maior concentração utilizada para diluir os OE) e, um grupo controle, no qual nenhuma substância foi adicionada à água marinha. Em todos os tratamentos foram avaliados os

seguintes parâmetros de qualidade de água: nitrito (NO_2), amônia tóxica (NH_3), e potencial hidrogeniônico (pH) através de kits colorimétricos (LabconTest); oxigênio dissolvido (OD) através de oxímetro digital com sensor óptico (YSI Pro ODO) e; nível de turbidez das soluções através de turbidímetro digital (Alfakit).

Individualmente e apenas uma vez, os peixes de cada tratamento foram inseridos em um recipiente de vidro contendo 1 litro de água marinha na temperatura de 25 °C, salinidade de 35 g L⁻¹ e a concentração específica do OE diluído (solução-estoque). Os testes foram realizados sempre da menor para a maior concentração de anestésico. As soluções eram descartadas e os recipientes eram lavados com detergente neutro e água; enxaguados com álcool e secos para iniciar os procedimentos em outro animal. Durante todo o processo, os peixes foram monitorados visualmente, para que fossem cronometrados e registrados os tempos para atingir cada um dos estágios anestésicos, sendo de interesse o estágio IV (Tabela 1).

Tabela 1. Comportamentos característicos de cada estágio anestésicos em peixes.

Estágio anestésico	Parâmetros comportamentais
I – sedação	Perda de reação ao toque e a estímulos visuais.
II – anestesia leve	Início de perda de equilíbrio, caracterizado pelo movimento natatório na posição normal intercalado por movimentação irregular (lateral).
III – anestesia profunda	Perda total de equilíbrio, natação descoordenada.
IV – anestesia cirúrgica	Redução do movimento opercular, ausência de movimentos natatórios.
V – colapso medular	Ausência de batimentos operculares.

FONTE: Pedrazzani & Ostrensky 2014.

Ao atingirem o estágio IV, os peixes foram imediatamente retirados do recipiente, levemente secos em papel absorvente, pesados e medidos (comprimento total, comprimento padrão e altura), simulando um manejo de rotina em piscicultura (biometria). Em seguida, para verificar a ocorrência de efeito analgésico foi realizado teste de sensibilidade, pressionando levemente a ponta de uma agulha no lábio de cada peixe, local onde normalmente se encontram fibras nociceptoras (Cooke & Sneddon 2007). Qualquer reação indicativa de dor (como

boquejamento ou salto) foi registrada como ausência de efeito analgésico. O tempo necessário para realização desses procedimentos também foi cronometrado e registrado.

Para avaliação do período necessário à recuperação anestésica, os peixes foram imediatamente colocados em outro recipiente de vidro contendo 1 L de água marinha sem anestésico, e aeração constante. Os peixes foram considerados recuperados quando responderam ao estímulo visual (movimento de objeto próximo à cabeça) e atingiram natação horizontal, aparentando retorno do equilíbrio. O tempo necessário para recuperação foi cronometrado e registrado.

Os grupos controle e branco foram os últimos a serem executados, pois se estabeleceu o maior tempo para indução anestésica com o uso dos óleos essenciais como tempo fixo para permanência dos peixes no interior do recipiente, anteriormente à realização da biometria e do teste de sensibilidade. O mesmo ocorreu no procedimento de recuperação, onde os peixes dos grupos controle e branco permaneceram contendo 1 litro de água limpa e aeração constante durante a média de intervalo de tempo necessário para a recuperação dos animais nos demais tratamentos.

Após a recuperação, os peixes foram transferidos para 17 tanques-redes (um para cada tratamento) imersos em um tanque com água marinha de características similares à anterior ao experimento. Foram alimentados 12h após o experimento e foram registrados a sobrevivência e possíveis comportamentos atípicos como falta de interesse pelo alimento e ausência ou dificuldade de natação nas 24, 48 e 72h subsequentes ao experimento.

2.3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos de cada OE foram analisados separadamente e os desempenhos de suas concentrações foram comparados entre si. A normalidade dos dados foi avaliada através de Shapiro-Wilk. Como os dados demonstraram-se não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar períodos de indução, de manejo e de recuperação. As correlações entre concentrações e tempos de indução anestésica, entre concentrações e tempos de recuperação e, entre tempos de indução e de recuperação foram avaliadas por regressão linear. Para todas as análises foi admitido o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

2.4 RESULTADOS

Em todos os tratamentos os parâmetros de qualidade da água (NO_2 , NH_3 , pH e OD) permaneceram em níveis adequados para o cultivo de peixes marinhos, segundo Poxton & Allouse (1982). Quanto à aparência das soluções, ocorreu elevação da turbidez com o aumento das concentrações dos fármacos (Tabela 2).

Conforme o esperado, os peixes dos grupos controle e branco não apresentaram efeito anestésico ou analgésico. Por outro lado, todas as concentrações de OE testadas promoveram nos animais analgesia e anestesia.

Houve diferença significativa entre as concentrações dos OE em relação ao tempo de indução anestésica (estágio IV; Figura 1), sendo os menores tempos observados nas maiores concentrações. Os peixes submetidos ao óleo de cravo ($p=0,0000$) obtiveram as menores medianas nos tratamentos de 60, 70 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ (67,5; 58,0 e 71 segundos, respectivamente) em relação à menor concentração (40 $\mu\text{L L}^{-1}$). Todavia, as concentrações de 40 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ não se diferenciaram estatisticamente. As concentrações de 250 e 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo de manjerição ($p=0,0058$), provocaram anestesia em menor tempo (medianas de 79 e 82 segundos, respectivamente) em relação à menor concentração, mas não diferiram da concentração de 200 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$. Para o óleo de melaleuca ($p= 0,0043$), as concentrações de 500 e 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ (medianas de 37,5 e 40 segundos, respectivamente) induziram estágio IV mais rapidamente que as duas menores concentrações, porém não diferiram de 400 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Todas as concentrações de OE de cravo e a concentração de 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ de manjerição provocaram efeito analgésico em 100% dos animais. Tal efeito também foi verificado em pelo menos 70% dos peixes submetidos às demais concentrações de OE de manjerição e de melaleuca (Tabela 2).

Não ocorreu diferença significativa entre os tempos necessários para a realização do manejo (biometria e teste de sensibilidade) nas diferentes concentrações de OE de cravo, bem como de manjerição. Contudo, houve diferença de tempo de manejo entre as concentrações de *M. alternifolia* ($p= 0,0186$), sendo o menor tempo (mediana = 65,5 segundos) observado na maior concentração que, no entanto, diferenciava-se estatisticamente apenas da menor concentração (Tabela 2).

Todos os animais anestesiados com OE de manjerição apresentaram espasmos musculares durante os procedimentos tanto de

Figura 1. Tempos (em segundos) de indução anestésica em *A. clarkii* em cada concentração dos OE, sendo (A) cravo *E. caryophyllata*, (B) manjerição *O. basilicum* e (C) melaleuca *M. alternifolia*.

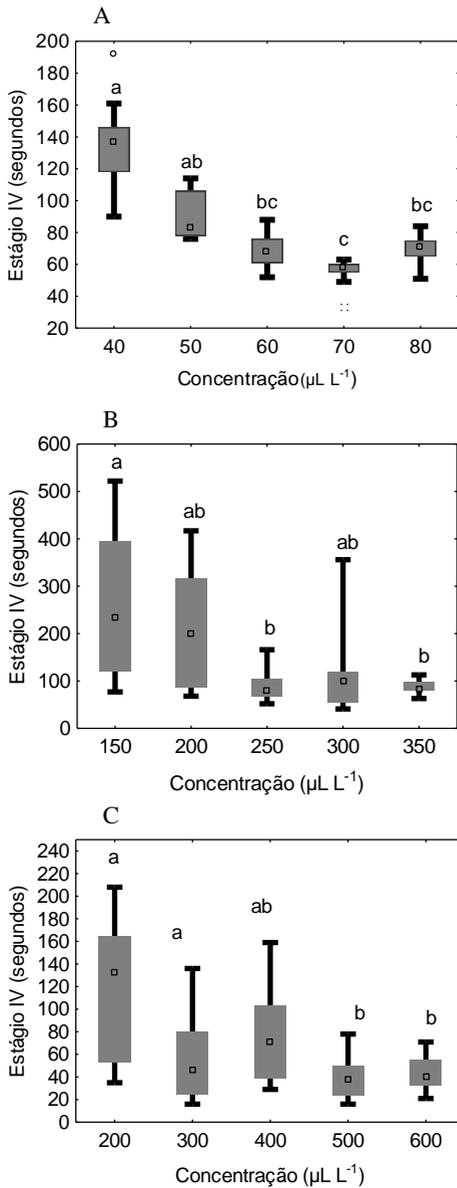


Tabla 2. Percentagem de animais que sofreram analgesia; medianas dos tempos (segundos) necessários para realização de biometria e mortalidade ocorrida durante e após exposição à cada concentração dos OE de cravo *E. caryophyllata*, manjerição *O. basilicum* e melaleuca *M. alternifolia* e parâmetros de qualidade da água.

ÓLEO	CONCENTRAÇÃO ANALGESIA BIOMETRIA			MORTALIDADE			QUALIDADE DA ÁGUA					
	($\mu\text{L L}^{-1}$)	(%)	(s)	(ind.)	durante 24H (ind.)	48H (ind.)	72H (ind.)	total OD (mg L ⁻¹)	pH	NO ₂ (mg L ⁻¹)	NH ₃ (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)
Cravo	40	100	58,0	0	0	0	0	0	8,3	8,0	0	3,2
	50	100	61,0	0	0	0	0	0	8,3	8,0	0	4,4
	60	100	62,0	0	0	0	0	0	8,3	8,2	0	5,2
	70	100	59,5	0	0	0	0	0	8,3	8,2	0	5,9
80	100	58,5	0	0	0	0	0	8,3	8,2	0	7,4	
Manjerição	150	70	78,0	1	0	0	1	20	8,3	8,0	0	36,1
	200	90	67,5	0	0	0	0	0	8,3	8,3	0	57,5
	250	100	81,5	0	0	0	0	0	8,3	8,3	0	84,5
	300	90	74,5	1	1	0	1	30	8,4	8,3	0	116,4
	350	90	71,0	0	0	1	0	10	8,4	8,3	0	142,5
Melaleuca	200	90	83,0 ^a	0	0	0	0	0	8,3	8,0	0	36,8
	300	70	74,5 ^{ab}	0	0	0	0	0	8,4	8,2	0	51,9
	400	70	79,5 ^{ab}	0	0	0	0	0	8,4	8,4	0	68,2
	500	90	74,5 ^{ab}	0	0	0	0	0	8,4	8,4	0	85,7
600	90	65,5 ^b	0	0	0	0	0	8,4	8,4	0	99,6	
Controle	0	0	85,5	0	0	0	0	0	8,4	8,0	0	0,0
Branco	5400	0	83,5	0	0	0	0	0	8,6	8,0	0	0,0

Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos do mesmo anestésico ($p < 0,05$). NTU = Unidades Nefelométricas de Turbidez

indução anestésica, quanto de manejo. Adicionalmente, ocorreram dois óbitos de peixes tratados com este mesmo OE assim que transferidos para o recipiente de recuperação (Tabela 2). Tais efeitos não ocorreram nos tratamentos com cravo e melaleuca.

As concentrações de 40 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo de cravo apresentaram maior rapidez para recuperação anestésica (medianas de 115 e 104 segundos, respectivamente), em relação às concentrações de 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$. Os demais OE não obtiveram diferença para tempo de recuperação entre as suas concentrações, permanecendo entre medianas de 67,5 e 79,5 segundos para o óleo de melaleuca e entre medianas de 184 e 294 segundos para o manjeriço (Figura 2).

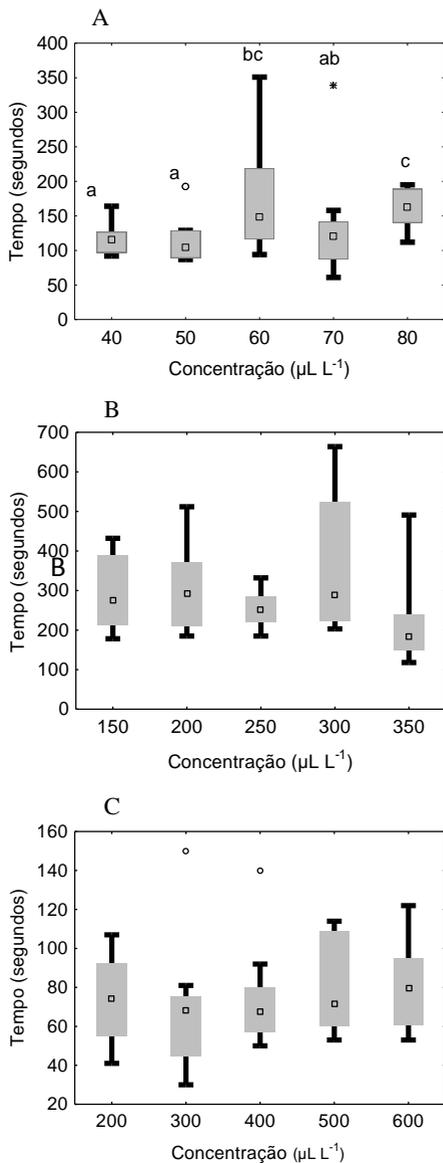
A análise de regressão linear demonstrou correlação negativa entre as concentrações de cada óleo e o tempo para atingir o estágio IV ($p > 0,05$; Tabela 3). Porém não houve correlação entre o tempo de indução e recuperação anestésicas em nenhum dos tratamentos. Também não houve correlação entre as concentrações dos fármacos e o tempo para recuperação dos animais.

Durante 72 horas subsequentes à exposição anestésica não foi observada alteração no comportamento alimentar e natatório, porém houve mortalidade de mais quatro animais tratados com manjeriço ao longo desse período de observação, totalizando 12% de mortalidade dos peixes submetidos a esse óleo (Tabela 2).

Tabela 3. Variáveis estudadas pela análise de regressão após o uso de óleos essenciais de cravo *E. caryophyllata*, manjeriço *O. Basilicum* e melaleuca *M. alternifolia* em *A. clarkii* (r = coeficiente de correlação; p = nível de significância e; r^2 = coeficiente de determinação).

VARIÁVEIS	CRAVO	MANJERICÃO	MELALEUCA
concentração do OE	$r = -0,7200$	$r = -0,5219$	$r = -0,5200$
x	$p = 0,0000$	$p = 0,0001$	$p = 0,0001$
tempo de indução	$r^2 = 0,0500$	$r^2 = 0,2724$	$r^2 = 0,2700$
concentração do OE	$r = 0,2300$	$r = -0,0900$	$r = 0,1410$
x	$p = 0,0968$	$p = 0,5300$	$p = 0,3287$
tempo de recuperação	$r^2 = 0,0500$	$r^2 = 0,0000$	$r^2 = 0,0199$
tempo de indução	$r = -0,1700$	$r = 0,2749$	$r = 0,2763$
x	$p = 0,2300$	$p = 0,0614$	$p = 0,0521$
tempo de recuperação	$r^2 = 0,0290$	$r^2 = 0,0756$	$r^2 = 0,0700$

Figura 2: Tempos (em segundos) para recuperação dos *A. clarkii* em cada concentração dos OE, sendo (A) cravo *E. caryophyllata* ($P = 0,0270$), (B) manjerição *O. basilicum* e (C) melaleuca *M. alternifolia*.



2.5 DISCUSSÃO

Conforme Marking & Meyer (1985) e Ross & Ross (2008), o tempo para indução anestésica não deve ultrapassar a margem de 180 segundos. No presente estudo, observou-se que, com exceção dos tratamentos de 150 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ de manjeriço, todos os demais apresentaram tempos (medianas) adequados para promoção de anestesia. Isto demonstra que todos os anestésicos utilizados permitiram o uso de concentrações que fossem efetivas em curto tempo de exposição.

A tendência observada neste trabalho de diminuição do tempo de indução anestésica, à medida que houve o aumento das concentrações, também foi observada em robalo peva *Centropomus parallelus* anestesiado com eugenol, com mentol e com benzocaína (Souza, Carvalho, Nunes, Scopel, Guarizi & Tsuzuki 2012), em linguado *Solea senegalensis* anestesiado com 2-phenoxyethanol, com metomidate, com OE de cravo e com MS-222 (Weber *et al.* 2009) e em garoupas *Epinephelus bruneus* anestesiadas com óleo de cravo (Park M.O., Hur, Im, Seol, Lee & Park I.S. 2008). Esta característica facilita o controle da administração e manutenção da anestesia.

De modo geral, a analgesia ou alívio da dor em animais aquáticos pode ser considerada quando estes não respondem ou diminuem a resposta a estímulos nocivos após sedação ou anestesia (Ross & Ross 2008). Esses mesmos autores ainda sugerem que um bom produto anestésico também deva promover analgesia. Todos os anestésicos ora utilizados apresentaram efeito analgésico nos *A. clarkii*, destacando-se o OE de cravo, que forneceu analgesia na totalidade dos indivíduos em todas as concentrações testadas.

A facilitação do manejo também é um dos requisitos para a classificação de um agente anestésico como uma substância eficaz. Entretanto, segundo Burka, Hammell, Horsberg, Johnson, Rainnie & Speares (1997), a habilidade do manejo é uma variável altamente subjetiva, pois depende do manipulador, dos peixes, dos procedimentos a serem executados, além de outros parâmetros. Todavia, os procedimentos de manejo (biometria e punção para verificar a ocorrência de efeito analgésico dos fármacos), foram realizados, no presente estudo, por um único manipulador, seguindo sempre a mesma ordem de execução, sob as mesmas condições físicas e de trabalho. Os peixes anestesiados com OE de cravo necessitaram de intervalos de tempo menores para o manejo, pois os mesmos permaneceram

completamente imóveis durante todo o processo, facilitando a manipulação.

As constantes contrações musculares involuntárias observadas nos peixes submetidos ao OE de manjerição, seguidas de mortalidade durante os experimentos e em até 72 horas após seu término, não foram relatadas por Silva, Parodi, Reckziege, Garcia, Bürger, Baldisserotto, Malmann, Pereira & Heinzmann (2012) e Benovit *et al.* (2012) em juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* e de linguado *Paralichthys orbignyanus*, respectivamente, anestesiados com OE de espécie do mesmo gênero, *O. gratissimum*. Todavia, Benovit *et al.* (2012) observou esses efeitos colaterais nos linguados anestesiados com *Aloysia gratissima*. Tal efeito também é relatado por Silva *et al.* (2013) em jundiá *Rhamdia quelen* submetidos à *Lippia sidoides*. Essa produção de excessivo estímulo muscular pode estar relacionada com inibição de acetilcolinesterase (AChE) nos músculos, devido ao possível aumento dos níveis de acetilcolina (Drummond & Russom 1990; Kirby, Morris, Hurst, Kirby, Neall, Tylor & Fagg 2000). Inibição da AChE também foi relatada “in vitro” para os componentes de OE de tomilho *Thymus vulgaris* sobre o peixe-elétrico *Electrophorus electricus* (Jukic, Politeo, Maksimovic, Milos & Milos 2007).

Em relação ao tempo de recuperação, o tempo máximo de 300 segundos é descrito como ideal para o retorno dos peixes ao estágio basal, segundo Marking & Meyer (1985) e Ross & Ross (2008). Neste estudo, todos os tratamentos apresentaram medianas de tempo abaixo do limite recomendado, sendo as de melaleuca e de cravo inferiores à 80 e 163 segundos, respectivamente, enquanto que as de manjerição eram próximas ao limite recomendado (máxima = 295 segundos). Contudo, a recuperação tardia observada no caso do manjerição pode ser conveniente para determinados procedimentos que necessitem de uma maior demora de retorno dos peixes após exposição anestésica, tais como cirurgias e reproduções induzidas (Prince & Powell 2000). Por outro lado, a concentração de 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ de manjerição apresentou duas amostras que ultrapassaram o limite máximo e, 50% da mortalidade observada no presente estudo ocorreram nesse tratamento.

As correlações negativas verificadas entre as concentrações utilizadas e os tempos de indução observados no presente trabalho também foram observadas em estudos realizados em juvenis de cavalomarinho *Hippocampus reidi* anestesiados com OE de *Lippia alba* (Cunha *et al.* 2011), em cavalos marinhos *Hippocampus kuda* adultos anestesiados com MS-222, benzocaína, OE de cravo e 2-

phenolxyethanol (Pawar *et al.* 2011) e, em sete espécies de peixes recifais anestesiadas com OE de cravo (Cunha & Rosa 2006).

A ausência de correlação significativa entre tempo de indução e de recuperação anestésica observada neste estudo também foi verificada por Ostrensky, Pedrazzani & Vicente (2015) em lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* submetido a MS-222 e propofol. Esses últimos autores, contudo, relatam correlação entre as concentrações dos fármacos e o tempo de recuperação dos peixes submetido à propofol. O mesmo também foi observado por Pawar *et al.* (2011) em cavalos marinhos anestesiados com MS-222, benzocaína, OE de cravo e com 2-phenolxyethanol e, por Cunha & Rosa (2006) em sete espécies recifais anestesiadas com OE de cravo. Entretanto, no presente trabalho não houve correlação entre as concentrações dos fármacos e o tempo para recuperação dos *A. clarkii*. Essas ausências de correlações entre tempo de retorno e tempo de indução, bem como entre tempo de recuperação e concentrações dos fármacos podem indicar que os intervalos de tempo para recuperação estão mais intensamente relacionados com a capacidade dos *A. clarkii* em eliminar as drogas do organismo do que com o tempo de exposição ao fármaco ou com a dosagem utilizada.

As menores dosagens de cada OE que resultaram em menores tempos de indução anestésica e de recuperação, maior analgesia no lote de peixes e ausência de mortalidade, foram 50, 250 e 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de cravo, manjerição e melaleuca, respectivamente. A dosagem ora recomendada de OE de cravo (50 $\mu\text{L L}^{-1}$, equivalente a 52,25 mg L^{-1}) para *A. clarkii* juvenis é similar aos 50 mg L^{-1} indicados por Pawar *et al.* (2011) para anestesia de cavalo marinho *Hippocampus kuda* (comprimento total $15,51 \pm 0,98$ cm e peso $11,15 \pm 1,68$ g), sugerindo uma ausência de relação de tamanho das espécies com a concentração do fármaco. A concentração 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de melaleuca, ora recomendada, confere com a dosagem indicada por Hajek (2011) para anestesia da espécie dulcícola carpa comum *Cyprinus carpio* (peso = 22 ± 6 g; média \pm desvio padrão). Não foram encontradas outras referências na literatura sobre uso de melaleuca em anestesia de peixes, bem como qualquer documentação sobre o uso de manjerição para esse fim.

2.6 CONCLUSÃO

Todos os OE testados no presente estudo provocaram efeitos anestésicos e analgésicos nos peixes. Entretanto, não se recomenda o uso de OE de manjerição *O. basilicum* em *A. clarkii*, devido aos

espasmos musculares que dificultaram o manejo e à ocorrência de mortalidade.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arvigo, R. & Balick, M. J. (1993) *Rainforest remedies: one hundred healing herbs of Belize*. (2nd Revised and Expanded Edition), 221p. Lotus Press, Twin Lakes.

Barton, B. A. & Iwama, G. K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* **1**, 3-26.

Benovit, S.C., Gressler, L.T. & Silva, L.L. (2012) Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with Essential Oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society* **43**(6), 896-900.

Bergqvist, J. & Gunnarsson, S. (2013) Finfish aquaculture: Animal welfare, the environment, and ethical implications. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **26**(1), 75-99.

Bilal, A., Jahan, N., Ahmed, A., Bilal, S.N., Habib, S. & Hajra, S. (2012) Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn-A review. *International Journal of Current Research and Review* **4**, 73-83.

Burka, J.F., Hammell, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J. & Speares, D.J. (1997) Drugs in salmonid aquaculture - a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**, 333-349.

Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2006) *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* **19**(1), 50-62.

Chandroo, K.P., Duncan, I. J. & Moccia, R.D. (2004) Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science* **86**(3), 225-250.

Cooke, S.J. & Sneddon, L.U. (2007) Animal welfare perspectives on recreational angling. *Applied Animal Behaviour Science* **104**(3), 176-198.

Cunha F.E.A. & ROSA I. L. (2006) Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. *Journal of Fish Biology* **69**, 1504–1512.

Cunha M.A, Silva B.F., Delunardo F.A.C., Benovit S.C., Gomes L.C., Heinzmann B.M. & Baldisserotto B. (2011) Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology* **9**(3): 683-688.

Drummond R.A. & Russom C.L. (1990) Behavioral toxicity syndromes: a promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**, 37–46.

Façanha, M. F., & Gomes, L. D. C. (2005) Efficacy of menthol as ananesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazonica* **35**(1), 71-75.

Gomes, L.D.C., Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Roubach, R. & Araujo-Lima, C.A.R.M. (2001) Efficacy of benzocaine as ananesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Journal World Aquaculture Society* **32**(4), 426-431.

Grandi, T.S.M., Trindade, J.A.D., Pinto, M.J.F., Ferreira, L.L. & Catella, A.C. (1989) Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **3**(2), 185-224.

Gullian, M. & Villanueva, J. (2009) Efficacy of tricaine methanesulphonate and clove oil as anaesthetics for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Research* **40**(7), 852-860.

Hajek, G. J. (2011) Theanaesthetic?like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research* **42**(2), 296-300.

Inoue, L.A.K.A., Santos Neto, C.D. & Moraes, G. (2003) Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural* **33**(5), 943-947.

Iversen M., Finstad B., McKinley R.S. & Eliassen R.A. (2003) The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S^k and Benzoak^R as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* **221**, 549–566.

Johnston, G., Kaiser, H., Hecht, T., & Oellermann, L. (2003) Effect of ration size and feeding frequency on growth, size distribution and survival of juvenile clownfish, *Amphiprion percula*. *Journal of Applied Ichthyology* **19**(1), 40-43.

Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M. & Milos, M. (2007) In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research* **21**(3), 259-261.

Kirby M.F., Morris S., Hurst M., Kirby S. J., Neall P., Tylor T. & Fagg A. (2000) The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* **40**(9), 780–791.

Marking L.L & Meyer F.P. (1985) Are better fish anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* **10**(6), 2-5.

Ostrensky A., Pedrazzani A.S. & Vicente A.L. (2015) Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2,6-diisopropylphenol) as anaesthetics for the tetra *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). *Aquaculture Research*, 1–12.

Pandey, A.K., Singh, P. & Tripathi, N.N. (2014) Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **4** (9), 682-694.

Park M.O., Hur W.J., Im S.Y., Seol D.W., Lee J. & Park I.S. (2008) Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research* **39**, 877-884.

Pawar H.B., Sanaye S.V., Sreepada R.A., Harish V., Suryavanshi U., Tanu & Ansari Z.A. (2011) Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). *Aquaculture* **311**, 155–161.

Pedrazzani A.S. & Ostrensky A. (2014) The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). *Aquaculture Research*, 1–8.

Pinsky, M. L., Montes Jr, H. R., & Palumbi, S. R. (2010) Using isolation by distance and effective density to estimate dispersal scales in anemonefish. *Evolution* **64**(9), 2688-2700.

Pirhonen, J. & Schreck, C.B. (2003) Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **220**, 507–514.

Poxton, M. G. & Allouse, S. B. (1982). Water quality criteria for marine fisheries. *Aquacultural Engineering* **1**(3), 153-191.

Prince A. & Powell C. (2000) Clove oil as an anaesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* **20**,1029–1032.

Ross L.G. & Ross B. (2008) *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* (3rd ed.), 236 p. Blackwell Publishing, Oxford.

Roubach R. & Gomes L.C. (2001) Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. *Panorama da Aquicultura* **11** (66), 37–40.

Silva, L.L., Parodi, T.V., Reckziege, P., Garcia V.O., Bürger M.E., Baldisserotto B., Malmann C.A., Pereira A.M.S. & Heinzmann B.M. (2012) Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism faction and tolerance in silver cat fish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* **350-353**, 91-97.

Silva, L.D.L., Silva, D.T.D., Garlet, Q.I., Cunha, M.A., Mallmann, C.A., Baldisserotto, B. & Heinzmann, B.M. (2013) Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver cat fish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology* **11**(2), 443-451.

Small B.C. (2003) Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* **218**, 177–185.

Sneddon, L.U. (2012). Clinical anesthesia and analgesia in fish. *Journal of Exotic Pet Medicine* **21**(1), 32-43.

Souza R.A.R., Carvalho C.V.A., Nunes F.F., Scopel B.R, Guarizi J.D. & Tszuki M.Y. (2012) Efeito comparativo da benzocaína, mentol e

eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. *Boletim do Instituto de Pesca* **38**(3), 247-255.

Soto C.G. & Burhanuddin C.G. (1995) Clove oil as a fish anesthetic for measuring length and weight of rabbit fish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* **135**, 149–152.

Thornhill, D.J. (2012). *Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade*. 179p. Defenders of Wildlife.

Wagner E., Arndt R. & Hilton B. (2002) Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* **211**, 353–366.

Weber R.A., Peleteiro J.B., García-Martín L.O. & Aldegunde M. (2009) The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture* **288**, 147-150.

Ye, L., Yang, S. Y., Zhu, X. M., Liu, M., Lin, J. Y., & Wu, K. C. (2011) Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecologica Sinica* **31**(5), 241-245.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ARVIGO, R. & BALICK, M.J. **Rainforest remedies: one hundred healing herbs of Belize**. Twin Lakes: Lotus Press, 1993.
- BARTON, B.A. & IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BERGQVIST, J. & GUNNARSSON, S. Finfish aquaculture: Animal welfare, the environment, and ethical implications. **Journal of agricultural and environmental ethics**, v. 26, n. 1, p. 75-99, 2013.
- BILAL, A. *et al.* Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn-A review. **International Journal of Current Research and Review**, v. 4, p. 73-83, 2012.
- BLANCHETON, J.P. Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. **Aquacultural engineering**, v. 22, n. 1, p. 17-31, 2000.
- CARSON, C.F.; HAMMER, K.A. & RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.
- CASTRO H.G. de *et al.* **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólicos secundários**. 2. Ed. Visconde do Rio Branco: UFV, 2004.
- CHANDROO, K.P.; DUNCAN, I.J.H. & MOCCIA, R.D. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3, p. 225-250, 2004.
- COOKE, S.J.; SNEDDON, L.U. Animal welfare perspectives on recreational angling. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, n. 3, p. 176-198, 2007.
- COUIC-MARINIER, F. & LOBSTEIN, A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. **Actualités Pharmaceutiques**, v. 52, n. 525, p. 18-21, 2013.

CUNHA, M.A. da *et al.* Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 3, p. 683-688, 2011.

EDWARDS, A.J. & SHEPHERD, A.D. Environmental implications of aquarium-fish collection in the Maldives, with proposals for regulation. **Environmental Conservation**, v. 19, n. 01, p. 61-72, 1992.

EKARATHNE, S.K. **A Review of the Status and Trends of Exported Ornamental Fish Resources and Their Habitats in Sri Lanka**. Rome: FAO, 2004.

FAÇANHA, M.F.; GOMES, L.C. Efficacy of menthol as an anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.

FRUTUOSO, A.E. *et al.* Óleos essenciais aplicados em alimentos: uma revisão. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campos Mourão, v. 4, n. 2, p. 69-81, 2013.

GOMES, L.C. *et al.* Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Journal World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001.

GRANDI, T.S.M. *et al.* Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989.

GULLIAN, M. & VILLANUEVA, J. Efficacy of tricaine methanesulphonate and clove oil as anaesthetics for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 7, p. 852-860, 2009.

HAJEK, G.J. The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 2, p. 296-300, 2011.

HERATH, H.M.T.N.B. & WIJewardene, L.N. **Ornamental Fish trade in Sri Lanka: An Economic Perspective**. International Research Journal of Environment Sciences, v. 3(8), 40-45, 2014.

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

IVERSEN M. *et al.* The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S^k and Benzoak^R as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, p. 549–566, 2003.

JOHNSTON, G. *et al.* Effect of ration size and feeding frequency on growth, size distribution and survival of juvenile clownfish, *Amphiprion percula*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlim, v. 19, n. 1, p. 40-43, 2003.

KAMADA, T. *et al.* Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 1, n. 2, p. 13-22, 1999.

KOBAYASHI, Y. *et al.* Sex-and tissue-specific expression of P450 aromatase (cyp19a1a) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 155, n. 2, p. 237-244, 2010.

KODAMA, G. *et al.* Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 61-72, 2011.

KOLDEWEY, H.J. & MARTIN-SMITH, K.M.A global review of seahorse aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 302, n. 3, p. 131-152, 2010.

LUZ, J.M.Q. *et al.* Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjeriço sob doses de cama de frango. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 349-353, 2009.

MACHADO, F.M.V.F. *et al.* Efeitos do uso de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) no perfil bioquímico de ratos Wistar. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 29, p. 191-4, 2011.

MADDUPPA, H.H. *et al.* Socio-economy of marine ornamental fishery and its impact on the population structure of the clown anemonefish *Amphiprion ocellaris* and its host anemones in Spermonde Archipelago, Indonesia. **Ocean & Coastal Management**, v. 100, p. 41-50, 2014.

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

PANDEY, A.K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N.N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 682-694, 2014.

PAWAR, H.B. *et al.* Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 311, n. 1, p. 155-161, 2011.

PEDRAZZANI, A.S.; OSTRENSKY, A.. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, 2014.

PINSKY, M.L.; MONTES JR., H.R.; PALUMBI, S.R. Using isolation by distance and effective density to estimate dispersal scales in anemonefish. **Evolution**, v. 64, n. 9, p. 2688-2700, 2010.

PIRARAT, N. *et al.* Lymphocystis disease in cultured false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 315, n. 3, p. 414-416, 2011.

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**, Amsterdam, v. 220, n. 1, p. 507-514, 2003.

ROSS, L.G. & ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.

ROUBACH R. & GOMES L.C. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v.11 (66), p. 37–40, 2001.

SHUMAN, C.S.; HODGSON, G. & AMBROSE, R.F. Population impacts of collecting sea anemones and anemonefish for the marine aquarium trade in the Philippines. **Coral Reefs**, v. 24, n. 4, p. 564-573, 2005.

SILVA, L.L. *et al.* Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013.

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

SNEDDON, L.U. Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. **Brain research**, v. 972, n. 1, p. 44-52, 2003a.

SNEDDON, L.U. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 83, n. 2, p. 153-162, 2003b.

SNEDDON, L.U.; BRAITHWAITE, V.A. & GENTLE, M.J. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1520, p. 1115-1121, 2003.

SNEDDON, L.U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, n. 1, p. 32-43, 2012.

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

TAVARES, I.B.; MOMENTÉ, V.G. & NASCIMENTO, I.R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2011.

THORNHILL, D.J. **Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade**. Defenders of Wildlife, v. 187, 2012.

WABNITZ, C. **From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species**. Cambridge: UNEP/Earthprint, 2003.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock

anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, n. 1, p. 353-366, 2002.

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

WILKERSON, J.D. **Clownfishes: A guide to their captive care, breeding & natural history**. Charlotte: Microcosm, 2003.

WITTENRICH, M.L. **The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes: Mating, Spawning & Rearing Methods for Over 90 Species**. Neptune City: TFH Publications, Incorporated, 2007.

WOOD, E.M. **Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies**. Ross-on-Wye: Marine Conservation Society, v. 80, 2001.

YE, L. *et al.* Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). **Acta Ecologica Sinica**, v. 31, n. 5, p. 241-245, 2011.

ZIEMANN, D.A. The potential for the restoration of marine ornamental fish populations through hatchery releases. **Aquarium Sciences and Conservation**, v. 3, n. 1-3, p. 107-117, 2001.

ANEXO A – Laudo Técnico do Óleo Essencial de cravo



LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Cravo Folha
(Eugenia caryophyllus)

Lote: 218	CAS Number: 8015-97-2
Fabricação: Junho/2014	Validade: Junho/2016

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido	Líquido
Cor	Amarelo	Amarelo Palha a Castanho
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Típico - Spice	Típico - Spice
Densidade (20°C)	1,045	1,030 – 1,050
Índice de Refração (20°C)	1,535	1,520 – 1,540
Refrração Ótica	-1,00°	[-2° ; 0°]
Data da Análise	18/07/2014	
Resultado	Aprovado	
Origem	Indonésia	
Principal componente (aprox.)	Eugenol = 86 %	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos, máscara e luvas recomendáveis. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Pode causar irritação à pele sensível Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não aspalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

ANEXO B – Laudo Técnico do Óleo Essencial de Manjeriço



LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Basilicão
(Ocimum basilicum)

Lote: 259	CAS Number: 8015-73-4
Fabricação: Maio/2014	Validade: Maio/2016

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Palha	Amarelo Palha a Amarelo Âmbar
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,957	0,948 – 0,970
Índice de Refração (20°C)	1,514	1,510 – 1,520
Rotação Ótica	- 0,22°	[-1° ; +2°]
Data da Análise	28/07/2014	
Origem	Índia	
Resultado	Aprovado	
Principal componente (aprox.)	Metilchavicol – 84%	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

ANEXO C - Laudo Técnico do Óleo Essencial de Melaleuca



FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Melaleuca (Tea Tree)
(Melaleuca alternifolia)

Lote: 192	CAS Number: 68647-73-4
Fabricação: Janeiro/2014	Validade: Janeiro/2017

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido	Líquido Limpido
Cor	Amarelo Palha	Incolor a Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,896	0,885 – 0,906
Índice de Refração (20°C)	1,478	1,470 – 1,482
Rotação Ótica	+ 7,8 °	[+5° ; +15°]
Data da Análise	07/03/2014	
Resultado	Aprovado	
Origem	Austrália	
Principais Componentes (aprox.)	Terpinen-4-ol – 42% Alpha terpinene – 10%	Gamma terpinene – 22% Cineol – 1,5%

Recomendações Especiais	
Manuseio	Riscos mínimos. Não ingerir. Evitar contato do produto puro com olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Produto inflamável a temperatura acima de 60°C. Perigo de fogo se exposto ao calor ou fonte de ignição. O líquido pode provocar irritação nos olhos, aparelho respiratório e digestivo. Polui as águas e o solo. O envio ao esgoto é proibido. As águas de combate ao fogo podem causar poluição.
Incôndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco a água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armaz enar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número da ONU: 1169 / Classe: 3 / LÍQUIDO INFLAMÁVEL

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754