



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Aquicultura

Anestesia e toxicidade aguda do eugenol aplicado em juvenis
de jundiá, *Rhamdia quelen*

Rafael Tanganelli Pallamin

Florianópolis – SC
2014



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Aquicultura

Anestesia e toxicidade aguda do eugenol aplicado em juvenis de
jundiá, *Rhamdia quelen*

Trabalho referente ao relatório de estágio,
apresentado ao Departamento de Aquicultura
do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção do título de
Engenheiro de Aquicultura.

Orientador: Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez

Florianópolis - SC
2014

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Astor Jr. e Carmen Silvia.

À memória de meus Avós, Astor e Nair.

Ao meu sobrinho que está por vir.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família;

Aos excelentes companheiros da equipe LAPAD;

Aos professores do LAPAD;

Aos professores que passaram por mais esta etapa na minha vida;

A todos, amigos, estagiários, envolvidos, colaboradores e que de alguma forma participaram neste presente trabalho;

Aos amigos criados, (alguns para vida toda);

Aos companheiros de moradia, foram muitos, mas, todos deixaram um pouco de si;

Em especial ao Professor Alex Pires de Oliveira Nuñez, pela oportunidade e dedicação e

Aos meus pais que me apoiam e me guiam sempre.

RESUMO

Durante o período de estágio foram realizados três experimentos envolvendo o agente anestésico eugenol, que foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, e utilizaram 664 juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), que apresentavam $4,24 \pm 0,60$ g e $6,77 \pm 0,45$ cm. O eugenol é um agente anestésico que apresenta baixo custo de aquisição, baixa toxicidade aos animais e aos seus manipuladores, assim, avaliou-se a eficiência anestésica do eugenol, estimando-se a dose ideal, (através dos tempos para indução e recuperação anestésica), as concentrações letais e o tempo de concentração letal. Os testes se basearam em banhos de imersão. O eugenol se mostrou eficaz para indução e recuperação anestésica em juvenis de jundiá. A concentração considerada ideal calculada foi de $83,47 \text{ mg.L}^{-1}$ eugenol, que induziu os animais à anestesia profunda em três minutos, com recuperação anestésica menor que 5 minutos. Após 600 segundos de exposição ao anestésico, as concentrações letais estimadas foram: 73,52; 178,11 e 431,48 mg L^{-1} eugenol, para CL_{01} , CL_{50} e CL_{99} , respectivamente. Para fins de eutanásia indica-se a concentração de 431,48 mg L^{-1} eugenol (600 segundos). Para a concentração de 75 mg.L^{-1} eugenol os tempos de concentração letal calculados foram: $TCL_{01} = 936$ segundos; $TCL_{50} = 3.254$ segundos e $TCL_{99} = 11.312$ segundos.

Palavras-chave: dose ideal, óleo- de-cravo, concentração letal,

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Juvenis de jundiá utilizados nos testes.....	10
Figura 2 - Tanques-estoque de 1.000 L.	12
Figura 3 - Aquário onde foi realizada indução à anestesia, em banho de imersão com agente anestésico eugenol.	13
Figura 4 - Balança de precisão e ictiômetro utilizados para as biometrias.....	14
Figura 5 - Aquário utilizado para a recuperação anestésica.	15
Figura 6 - Banhos de imersão por 600 segundos para cálculo da Concentração Letal.	16
Figura 7 - Juvenis de jundiá em anestesia profunda.	16
Figura 8 - Regressão entre o tempo de indução à anestesia e as concentrações de eugenol $Y=9948,675X^{-0,9065}$, $R^2 = 0,88$, para juvenis de jundiá.....	17
Figura 9 - Regressão entre a recuperação anestésica e as concentrações de eugenol, $Y = 52,15X^{0,35}$, $R^2 = 0,64$) para juvenis de jundiá.	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estágios de indução anestésica, segundo Ross e Ross (1999).....	13
Tabela 2 - Estágios de recuperação anestésica. Modificado por Vidal et al. (2008) de Hikasa et al. (1986).....	14
Tabela 3 - Quantificação das mortalidades ocorridas em cada uma das concentrações testadas para CL e TCL.....	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. LAPAD - Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce.....	7
1.2. ANESTÉSICOS PARA A PISCICULTURA.....	7
1.3. EUGENOL.....	8
1.4. ESPÉCIE UTILIZADA	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Experimento 1: Avaliação da eficiência da utilização do eugenol para indução e recuperação à anestesia edeterminação da concentração ideal	12
3.2. Experimento 2 - Determinação da concentração letal (CL).....	15
3.3. Experimento 3 - Determinação do tempo na concentração letal em juvenis de jundiá expostos a75 mg L ⁻¹ eugenol.	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

1.1. LAPAD - Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce

Durante período de estágio foram realizados três experimentos, desenvolvidos no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), do Departamento de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina. Dentre as inúmeras áreas de atuação, o LAPAD vem se dedicando há alguns anos ao desenvolvimento de tecnologias para o cultivo das espécies nativas migradoras do rio Uruguai, ou das espécies nativas regionais consideradas de interesse para a piscicultura, são algumas delas: o jundiá (*Rhamdia quelen*), o bocudo (*Steindachneridion scriptum*), o dourado (*Salminus brasiliensis*), o surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), a piava (*Leporinus obtusidens*) e a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). No presente estudo, o jundiá foi a espécie estudada.

1.2. ANESTÉSICOS PARA A PISCICULTURA

A alta produtividade na criação de animais geralmente não tem sido compatível com práticas que visem o bem-estar dos mesmos (VOLPATO, 2007). A fim de diminuir possíveis efeitos adversos que as técnicas utilizadas para obtenção desta produtividade possam induzir aos animais indica-se o uso de anestésicos, de modo que o seu uso atende a questões éticas que preconizam a utilização de produtos para evitar ou minimizar o sofrimento dos peixes nas práticas rotineiras nas estações de piscicultura (HUBBEL et al., 1989; ROSS; ROSS, 2008). Existem trabalhos que comprovam a diminuição do estresse causado pelo manejo devido o uso de anestésicos, deste modo, estudos com agentes anestésicos são indispensáveis para a redução do estresse de manejo em peixes.

A escolha do anestésico deve estar baseada em critérios como eficácia do produto, custo de aquisição, disponibilidade no mercado, segurança de uso e os possíveis efeitos colaterais deste produto aos peixes, aos seres humanos e ao ambiente (MARKING; MEYER, 1985; IVERSEN et al., 2003). É necessário, portanto, conhecer concentrações seguras de cada agente anestésico, evitando assim alterações metabólicas que podem interferir no crescimento, na reprodução ou causar morte por superdosagem, além de evitar o desperdício

do produto, reduzindo assim os custos de produção (SUMMERFELT; SMITH, 1990; ROUBACH; GOMES, 2001; PARK et al., 2008).

Os anestésicos variam em relação à eficácia, a segurança, a concentrações, a resistência e a tolerância dos peixes a estes produtos, portanto, é muito importante a avaliação da eficácia do anestésico para cada espécie, sendo necessário considerar especialmente a relação que existe entre concentração de anestésico e tempo de indução a anestesia. O anestésico considerado ideal deve produzir anestesia no máximo em três minutos, com tempo de recuperação até cinco minutos (MARKING; MEYER, 1985) e deve ser eficaz em baixas concentrações e apresentar toxicidade em doses muito superiores às efetivas (MARKING; MEYER; 1985; ROSS; ROSS, 2008).

Muitos produtos químicos são utilizados para anestésiar peixes. No Brasil são utilizados o MS-222 (triclaína metano sulfonato), a benzocaína (ethyl-p-aminobenzoato), a quinaldina (2-4-metilquinolina) ou a quinaldina sulfato (sulfato de 2-4-metilquinolina), o 2-fenoxietanol (Sigma®) ou etileno glicol éter fenil éter – C₈H₁₀O₂ (Merck®) e o mentol (ROUBACH; GOMES, 2001), porém não existe legislação que regulamente o uso destes produtos para peixes no país. Por essa razão são adotadas as recomendações da Food and Drug Administration (FDA), que aprova o uso do MS-222 em peixes destinados ao consumo humano nos Estados Unidos (ROUBACH; GOMES, 2001; NOCHETTO et al., 2009). Ainda segundo a FDA, os animais que são tratados com esse químico só podem ser consumidos 21 dias após contato com o produto. Como o MS-222 não é produzido no Brasil, o custo para sua aquisição é elevado, o que dificulta a sua utilização.

1.3. EUGENOL

Como uma das alternativas disponíveis no mercado brasileiro, encontramos o eugenol, que é um agente anestésico que já vem sendo utilizado em centros de pesquisa e estações de piscicultura, que tem se mostrado eficaz, que apresenta baixo custo de aquisição, e que é considerado adequado para o meio ambiente e para os manipuladores, sem riscos aparentes de intoxicação (ROUBACH et al., 2001; INOUE et al., 2003; IVERSEN et al., 2003). O eugenol é utilizado principalmente na odontologia e na medicina como antisséptico, analgésico e agente anestésico (DAVIDSON et al., 2000).

O composto fenólico eugenol (4-alil-2- metoxifenol-C₁₀H₁₂O₂) é uma substância ativa que atua como depressor do sistema nervoso central (ANDERSON et al., 1997), cuja concentração varia de 70 a 95% da composição total do óleo essencial do cravo-da-índia

Syzygium aromaticum (MAZZAFERA, 2003), obtido pela destilação das folhas e flores (incluindo talos) desta árvore.

Estudos foram realizados testando doses de eugenol em diferentes espécies de peixes. Gonçalves et al. (2008), trabalhando com juvenis de *Piaractus mesopotamicus*, concluíram que o eugenol seria um anestésico eficiente em substituição à benzocaína. Cunha et al. (2010), testaram o tempo para indução, resposta ao cortisol e análise sensorial do filé em jundiá, *Rhamdia quelen*, notaram que peixes anestesiados (50mg.L⁻¹ eugenol) apresentaram níveis significativamente mais baixos do cortisol plasmático do que peixes do grupo de controle, provando este ser um inibidor do aumento do cortisol no sangue. Porém, o teste sensorial demonstrou que o eugenol modifica o sabor dos filés e conseqüentemente é contraindicado para a anestesia quando os animais forem destinados ao consumo humano, o que demonstra a falta de estudos com esse fármaco.

Segundo CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2013), o eugenol e o óleo de cravo da Índia são recomendáveis para eutanásia nas classes Osteichthyes (peixes ósseos) e Chondrichthyes (peixes cartilagosos), ou seja, causam pouco ou nenhum sofrimento e causam a morte de forma humanitária quando usados de forma isolada. O eugenol causa bloqueio neuromuscular competitivo, e aparentemente potencializa o ácido gama aminobutírico (GABA) e também é antagonista de receptores NMDA.

1.4. ESPÉCIE UTILIZADA

Ainda que o Brasil apresente grande diversidade de espécies de peixes, sendo muitas aptas para piscicultura (WEINGARTNER et al., 2008), existem poucas informações sobre as técnicas de manejos mais adequadas para o cultivo de peixes nativos, no entanto, o estudo com estas tem aumentado nos últimos anos devido ao crescente interesse pela criação dessas (CRESCÊNCIO, 2005).

Para os presentes trabalhos juvenis da espécie jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), foram utilizados (Figura 1). Anteriormente pertencente à família Pimelodidae, após a revisão taxonômica realizada por Bockmann e Guazzelli (2003), atualmente pertence à família Heptapteridae, ordem dos Siluriformes. Vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GUEDES, 1980).

Tem grande importância para a pesca e piscicultura, sendo a espécie nativa mais cultivada da região Sul do Brasil (ZANIBONI-FILHO et al., 2004). A produção nacional de jundiá cultivado vem crescendo, sendo que no ano de 2011 atingiu a marca de 1.747,3 toneladas (MPA, 2011). Com boa aceitação para consumo no sul do Brasil, foram produzidas 757 toneladas pela piscicultura continental no estado de Santa Catarina em 2011, passando de uma participação de 1,8% em 2010 para uma representação de 2,5% no ano de 2011, o que em termos numéricos equivale a 172 toneladas a mais sobre o ano anterior (SILVEIRA et al., 2012).

O jundiá é uma espécie de peixe que ocorre na região do alto Rio Uruguai, apresentando características zootécnicas positivas, como o porte e a adaptação às variações climática da região sul do Brasil.

Muitos estudos já foram desenvolvidos com essa espécie, que contribuíram para a determinação das condições adequadas para a sua criação em cativeiro, no entanto, muitas informações ainda não estão disponíveis.

Figura 1 - Juvenis de jundiá utilizados nos testes.



2. OBJETIVOS

- Avaliar a eficiência anestésica do eugenol para juvenis de jundiá;
- Determinar a dose ideal para indução e recuperação anestésica utilizando o agente anestésico eugenol em juvenis de jundiá;
- Estipular as concentrações letais do agente anestésico eugenol para juvenis de jundiá;
- Estipular o tempo de concentração letal do agente anestésico eugenol em juvenis de jundiá.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, nos quais foram utilizados 664 juvenis de jundiá (*R. quelen*), que apresentavam $4,24 \pm 0,60$ g e $6,77 \pm 0,45$ cm, (média±desvio-padrão).

Os animais foram adquiridos de um produtor comercial, passaram por período de aclimação de uma semana e posteriormente foram mantidos em dois tanques-estoque de 1.000 L (Figura 2). Segundo Camargo, Pouey e Vaz (2006), testando o efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos em jundiás ($20,4 \pm 1,5$ cm e peso médio de $137,3 \pm 29,9$ g) por 30 dias, o jundiá não sofre estresse osmótico, pois não foi encontrada variação significativa da hemoglobina e do hematócrito para as diferentes concentrações de sal de 0, 2, 4, 6 e 8 ppt.

Os tanques-estoque eram conectados a um sistema de recirculação fechado de água, proporcionando o controle sobre a temperatura ($\pm 25^\circ$ C) e qualidade da água, através do uso de aquecedores e filtros. Em cada tanque existia aeração constante, devido o uso de sopradores de ar.

Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada contendo 36% de proteína bruta, que foi oferecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Nos períodos anteriores aos testes os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas.

Neste sistema fechado foi mantida uma baixa salinidade (± 2 ppt), produzida através da adição de NaCl, com o intuito da prevenção de patógenos.

As concentrações testadas do eugenol (Eugenol, Iodontosul[®], Porto Alegre, Brasil), devido à sua natureza oleosa, foram obtidas a partir da diluição do anestésico em álcool etílico (96°), formando uma solução-estoque com concentração $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (VIDAL et al., 2008).

Figura 2 - Tanques-estoque de 1.000 L.



3.1. Experimento 1: Avaliação da eficiência da utilização do eugenol para indução e recuperação à anestesia edeterminação da concentração ideal

Foram testadas as concentrações de: 50; 62,5; 75; 87,5 100; 125 e 150 mg.L⁻¹eugenol, sendo que para cada concentração 20 juvenis de Jundiá foram utilizados. Cada peixe foi retirado aleatoriamente dos tanques-estoque e submetido individualmente ao tratamento em banho de imersão, para melhor visualização, realizado em aquário de vidro (Figura 3), com volume de 20 litros e contendo 5 litros da solução (água com eugenol). Durante o teste foi mantida aeração constante e controle da temperatura ($\pm 25^{\circ}$ C).

Para se caracterizar os estágios de anestesia, foi cronometrado o tempo que cada animal utilizou para atingir o estágio V, conhecido como estágio de anestesia profunda, seguindo a proposta metodológica de Ross e Ross. (1999) (Tabela 1).

Um grupo controle também foi utilizado, e nele os animais passaram pelos mesmos procedimentos experimentais, mas em água sem o agente anestésico, para o monitoramento dos parâmetros comportamentais e da mortalidade que poderiam estar relacionados apenas aos manejos utilizados nos tratamentos.

Após indução à anestesia foi realizada biometria, medindo-se peso e comprimento (Figura 4) dos animais, e posteriormente eles foram transferidos para um aquário com água sem agente anestésico (Figura 5), para a determinação do tempo de recuperação anestésica.

Este tempo foi registrado quando se obteve total recuperação do equilíbrio e capacidade normal de natação, indicada pelo estágio V nos critérios estabelecidos por Hikasa et al.(1986), modificado por Vidal et al. (2008) (Tabela 2).

Figura 3 - Aquário onde foi realizada indução à anestesia, em banho de imersão com agente anestésico eugenol.



Tabela 1 - Estágios de indução anestésica, segundo Ross e Ross (1999).

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

Tabela 2 - Estágios de recuperação anestésica. Modificado por Vidal et al. (2008) de Hikasa et al. (1986).

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

Com base nos resultados foi definida a concentração ideal, tendo-se como premissa que o anestésico deve produzir anestesia em doses mínimas do produto dentro do tempo máximo de três minutos, com um tempo de recuperação anestésica de até cinco minutos (MARKING; MEYER, 1985).

Após os procedimentos, os peixes foram mantidos em observação por uma semana pós-tratamento, para avaliação comportamental e registro de mortalidade causada pelos diferentes tratamentos.

A dose ideal para o tempo de indução à anestesia foi obtida a partir da análise de regressão entre o tempo de indução da anestesia e as concentrações de eugenol, para esta foi utilizado o programa Curve Expert Professional, versão 2.0.3 (HYAMS, 2013).

Figura 4 - Balança de precisão e ictiômetro utilizados para as biometrias.



Figura 5 - Aquário utilizado para a recuperação anestésica.



3.2. Experimento 2 - Determinação da concentração letal (CL)

Neste experimento foram testadas as concentrações: 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 e 300 mg L⁻¹ eugenol, utilizando-se 3 repetições por tratamento e 12 peixes por repetição.

Os juvenis de jundiá dos tanques-estoque receberam banhos de imersão por 600 segundos (VELÍŠEK et al., 2005b), para os quais foram utilizados tanques plásticos (Figura 6 e 7) com capacidade de 20 L, contendo 5 L de solução (água mais eugenol), que receberam aeração constante e controle da temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

Após a exposição ao eugenol os peixes foram transferidos para aquários de vidro contendo água sem os agentes anestésicos e observados durante 30 minutos, sob aeração constante e controle da temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Os juvenis que não apresentaram sinal de recuperação (retorno dos movimentos operculares) após este período, foram registrados como mortos (VIDAL et al., 2007a). As concentrações letais de eugenol foram estimadas por meio da análise PROBIT (EPA computer probit analysis program - Version 1.5).

Figura 6 - Banhos de imersão por 600 segundos para cálculo da Concentração Letal.



Figura 7 - Juvenis de jundiá em anestesia profunda.



3.3. Experimento 3 - Determinação do tempo concentração letal em juvenis de jundiá expostos a 75 mg L⁻¹ eugenol.

Para este teste foi utilizada a concentração de 75 mg L⁻¹ eugenol (concentração próxima à ideal, calculada no primeiro experimento), sendo testados os tempos de exposição ao agente anestésico de: 600, 1.200, 1.800, 2.400, 3.000 e 3.600 segundos, seguindo-se a mesma metodologia descrita no experimento anterior.

4. RESULTADOS

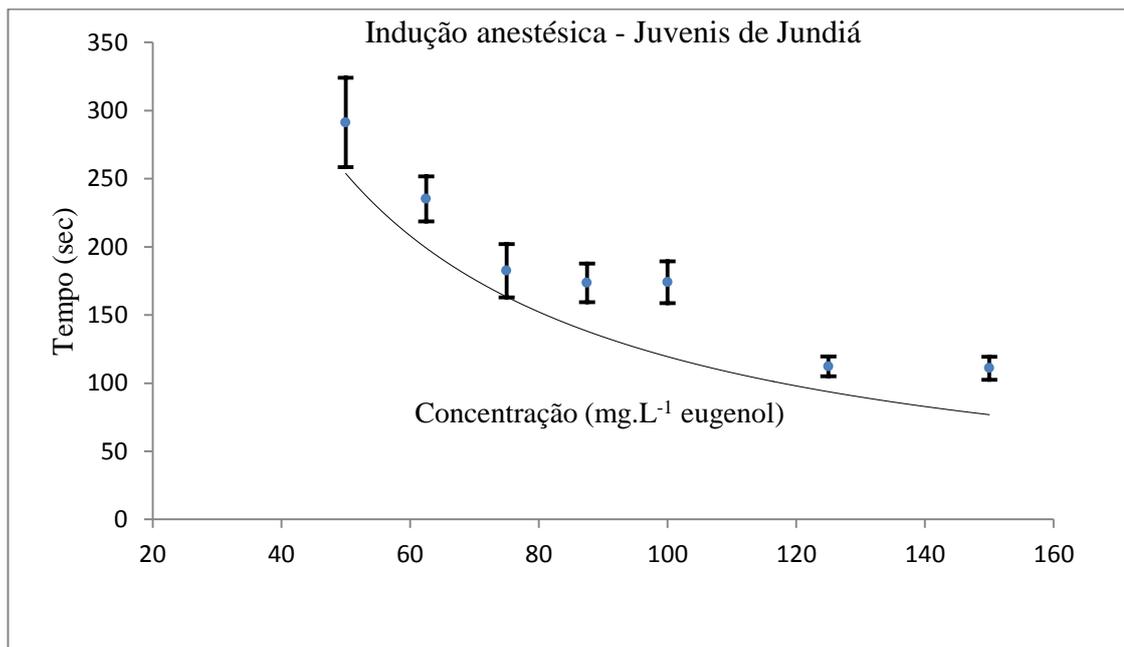
Os peixes recém-introduzidos no aquário contendo a solução com eugenol apresentaram hiperatividade, demonstrando comportamento de “tosse” com reflexo de regurgitação.

Todas as concentrações testadas no primeiro experimento induziram à anestesia profunda. Durante os testes e no período pós-tratamento não foi registrada mortalidade para os peixes do primeiro experimento, os animais apresentaram natação normal e captura efetiva de alimento no período pós-tratamento.

Nas menores concentrações testadas, 50 e 62,5 mg L⁻¹ eugenol, os animais apresentaram valores maiores que o considerado ideal para a indução anestésica de 3 minutos, propostas por Marking e Meyer (1985). Com o aumento das concentrações, ocorreu uma significativa redução no tempo de indução anestésica (Figura 8).

Para todas as concentrações o tempo de recuperação foi inferior ao ideal (5 minutos), ocorrendo efeito contrário ao da indução, ou seja, com o aumento das concentrações ocorre um significativo incremento no tempo de recuperação anestésica (Figura 9).

Figura 8 - Regressão entre o tempo de indução à anestesia e as concentrações de eugenol $Y=9948,675X^{-0,9065}$, $R^2 = 0,88$, para juvenis de jundiá.



A relação entre o tempo de indução à anestesia e as concentrações de eugenol para juvenis de jundiá (Figura 8), está representada pela equação $Y=9948,675X^{-0,9065}$ ($p < 0,01$; $R^2 = 0,88$). Através desta equação obtivemos a dose ideal para o tempo de indução considerado máximo ideal, de 180 s (3 minutos), que foi calculada em $83,47 \text{ mg.L}^{-1}$ eugenol. O modelo matemático que representa a relação entre o tempo de recuperação anestésica e as concentrações de eugenol (Figura 9) foi $Y=52,15X^{0,35}$ ($p < 0,01$, $R^2 = 0,64$).

Após 600 segundos de exposição ao anestésico, as concentrações letais (CL) estimadas foram: $CL_{01} 73,52 \text{ mg L}^{-1}$; $CL_{50} 178,11 \text{ mg L}^{-1}$ e $CL_{99} 431,48 \text{ mg.L}^{-1}$ eugenol. Para fins de eutanásia foi indicada, portanto, a concentração de $431,48 \text{ mg L}^{-1}$ eugenol (600 segundos).

Na Tabela 3 pode-se observar a mortalidade ocorrida em cada um dos tratamentos testados para CL e TCL.

Para a concentração de 75 mg.L^{-1} eugenol, em juvenis de jundiá, os diferentes intervalos determinaram os seguintes tempos de concentração letal: 936 s, 3.254 s e 11.312 s, para TCL_{01} , TCL_{50} e TCL_{99} , respectivamente. A dose ideal calculada no primeiro experimento ($83,47 \text{ mg.L}^{-1}$ eugenol) baseada no tempo de indução de 180 segundos foi considerada segura, verificando-se o TCL_{01} estimado em 75 mg.L^{-1} eugenol ser aproximadamente 5,2 vezes maior, o que produz uma margem teórica de segurança de 756 s.

Figura 9 - Regressão entre a recuperação anestésica e as concentrações de eugenol ($Y = 52,15X^{0,35}$, $R^2 = 0,64$) para juvenis de jundiá.

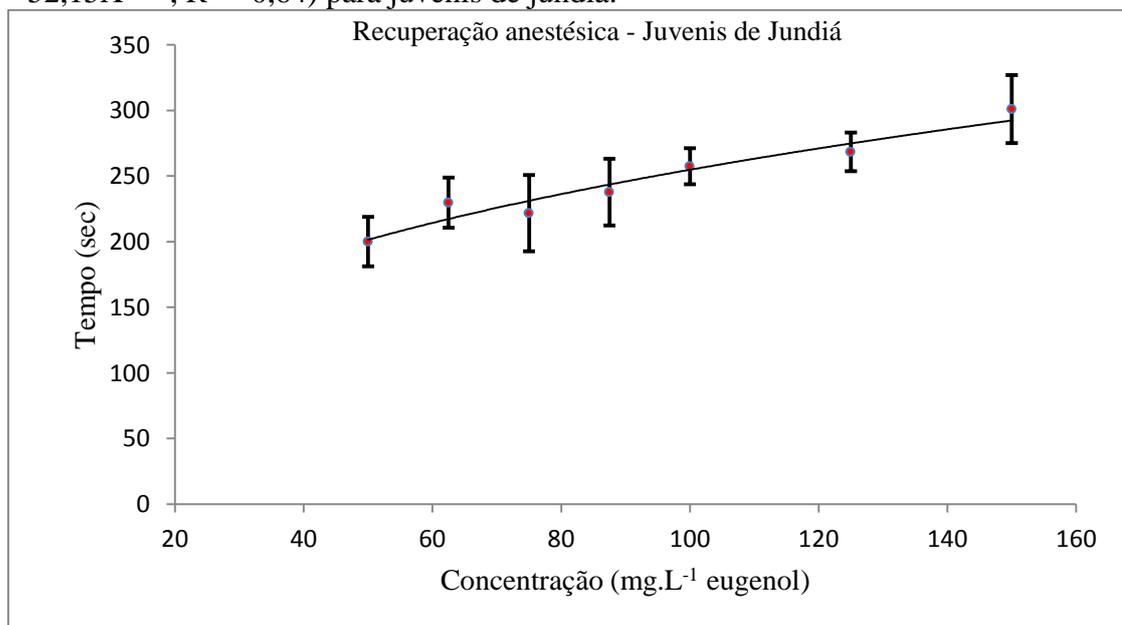


Tabela 3 - Quantificação das mortalidades ocorridas em cada uma das concentrações testadas para CL e TCL.

Concentrações (mg.L ⁻¹ eugenol)	CL		Tempo (s)	TCL (75 mg.L ⁻¹ eugenol)	
	Vivos	Óbitos		Vivos	Óbitos
50	36	0	600	35	1
75	35	1	1200	35	1
100	34	2	1800	32	4
125	30	6	2400	30	6
150	25	11	3000	26	10
200	13	23	3600	6	30
250	8	28			
300	2	34			

5. DISCUSSÃO

Os peixes recém-introduzidos no aquário com eugenol apresentaram hiperatividade, demonstrando comportamento de “tosse” com reflexo de regurgitação. Este comportamento também foi descrito por Grushet al. (2004) em *Danio rerio* e por Vidal et al. (2006) em juvenis de *Pseudoplatystoma corruscans*. Essa reação provavelmente é devido à própria substância anestésica (eugenol), mas, por outro lado, estudo comparativo entre o eugenol, MS-222, quinaldina, benzocaína e 2-fenoxietanol em *Pomacentrus amboinensis* mostrou que essa reação à substância anestésica é menos intensa quando o eugenol é utilizado (MUNDAY E WILSON, 1997 apud VIDAL et al., 2006).

Estudos demonstram a importância dos estudos espécie-específicos para o emprego dos anestésicos. Testando o eugenol como anestésico para o siluriforme Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) na faixa de temperatura de 28,1 ± 0,6 °C, Ribeiro et al. (2013) também obtiveram 100 % de sobrevivência no período pós-tratamento, corroborando o registrado neste estudo. Para *Pimephales promelas*, no entanto, a anestesia com 100 mg.L⁻¹ eugenol propiciou apenas 60% de sobrevivência (PALIC et al., 2006).

A regressão entre o tempo de indução e a concentração de eugenol corrobora modelos matemáticos encontrados por outros autores, à medida que quando as concentrações de eugenol se elevaram ocorre a redução do tempo para indução anestésica (INOUE et al., 2003; VIDAL et al., 2006; VIDAL et al., 2007b; DIEMER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013).

Testes com eugenol em juvenis de Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, pesando $27,76 \pm 7,7$ g, sob $24 \pm 0,1^\circ\text{C}$, com as concentrações de 25, 50, 75 e 100 mg L^{-1} , indicaram a concentração de 50 mg L^{-1} como a considerada mais adequada para procedimentos usuais no manejo (VIDAL et al., 2006). Quando testado em juvenis de matrinxã, *Brycon cephalus* (3,3 g) nas concentrações de 50,00; 62,50, 75,00; 100,00; 125,00; 150,00; 175,00 e 200,00 mg L^{-1} eugenol, indicaram concentrações de 50 até 100 mg L^{-1} para a indução à anestesia profunda (VIDAL et al., 2007b), valores que corroboram com a dose ideal estipulada no presente trabalho para juvenis de jundiá.

Diemer et al. (2012) testaram o efeito anestésico do eugenol para *Rhamdia voulezi*, utilizando cinco diferentes classes de peso: 32,5; 75; 150; 300 e 450 g e quatro concentrações de eugenol 50, 75, 100 e 125 mg L^{-1} . Em todas as concentrações avaliadas os peixes atingiram ausência de reação a qualquer estímulo (anestesia profunda). O mesmo ocorrido neste para o jundiá a partir da concentração de 50 mg L^{-1} eugenol. Neste mesmo trabalho 96 horas após a recuperação anestésica não foram verificadas mortalidades dos peixes.

Para carpa comum, *Cyprinus carpio* os valores de concentração letal aos 600 segundos foram, CL_{01} $51,6 \text{ mg L}^{-1}$, CL_{50} $74,3 \text{ mg L}^{-1}$ e CL_{99} $110,1 \text{ mg L}^{-1}$ eugenol (VALISEK et al., 2005a), para Truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* CL_{01} $63,9 \text{ mg L}^{-1}$, CL_{50} $81,1 \text{ mg L}^{-1}$, CL_{99} $100,1 \text{ mg L}^{-1}$ (VALISEK et al., 2005b); ambos com valores menores dos encontrados para juvenis de jundiá, esses experimentos foram realizados a $19,9$ e 14°C , respectivamente.

A temperatura em que foram realizados os trabalhos pode influenciar os resultados, Woosley et al. (2004) trabalhando com a truta arco-íris ($0,18 \pm 0,01$ g), expostas ao óleo-de-cravo nas diferentes temperaturas 11, 15 e 20°C , relataram que as larvas apresentam valores de mortalidade mais altos 24h pós tratamento quando estes em temperaturas mais elevadas. A temperatura corporal dos peixes é igual a do meio em que vivem, de modo que o seu aumento eleva a taxa metabólica dos animais e, por consequência, o consumo de oxigênio (SCHMIDT-NILSEN (2002) apud. VIDAL et al., 2007). Os peixes podem compensar a elevada demanda por oxigênio com maior número e/ou amplitude dos movimentos respiratórios, possibilitando que mais água passe pelas brânquias, assim como as substâncias nela dissolvidas (SCHMIDT-NILSEN, 2002 apud VIDAL et al., 2007).

Em *Oreochromis niloticus*, (tilápia-do-Nilo) com peso médio de 5,34 g, foram testadas as concentrações de 50,75, 100, 150, 200, 250 e 300 mg L^{-1} eugenol, com isso, foi estipulado o valor de concentração letal médio (CL_{50}) aos 600 s em $184,26 \text{ mg L}^{-1}$ eugenol, valor próximo ao do presente trabalho ($178,11 \text{ mg L}^{-1}$ eugenol). Para eutanásia (CL_{99}) foi estipulado para Tilápia-do-Nilo, valores mais baixos: $286,55 \text{ mg L}^{-1}$ eugenol contra os $431,48 \text{ mg L}^{-1}$

eugenol para os juvenis de jundiá. Os tempos de concentrações letais (TCL) para tilápia-do-Nilo também foram inferiores: TCL₀₁, 566,97 s; TCL₅₀, 1.611,66 s; e TCL₉₉, 2.656,34 (VIDAL et al., 2008). Este comparativo demonstra eugenol ter uma menor toxicidade para os juvenis de jundiá.

6. CONCLUSÕES

Em juvenis de jundiá contendo $4,24 \pm 0,60$ g e $6,77 \pm 0,45$ cm, o Eugenol se mostrou eficaz para indução e recuperação anestésica;

A concentração considerada ideal para anestesia profunda em três minutos com recuperação anestésica menor que 5 minutos foi calculada em $83,47 \text{ mg.L}^{-1}$ eugenol;

Após 600 segundos de exposição ao anestésico, as Concentrações Letais estimadas foram: CL₀₁ $73,52 \text{ mg L}^{-1}$; CL₅₀ $178,11 \text{ mg L}^{-1}$ e CL₉₉ $431,48 \text{ mg L}^{-1}$ eugenol;

Para fins de eutanásia ficou estabelecida a concentração de $431,48 \text{ mg L}^{-1}$ eugenol (600 segundos);

Para a concentração de 75 mg.L^{-1} eugenol, os tempos de concentração letal calculados foram: TCL₀₁ 936 s; TCL₅₀ 3254 s e TCL₉₉ 11312 s;

A dose ideal calculada no primeiro experimento ($83,47 \text{ mg.L}^{-1}$ eugenol) tem uma margem teórica de segurança de 756 s.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, W.G.; MCKINLEY, S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, Bethesda, 17(2): 301-307, 1997.

BOCKMANN, F. A.; GUAZZELLI, G. M. Heptapteridae. In.: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. (Orgs.) **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p.406-431.

CAMARGO, S. G. E.; OSÓRIO, J. L. O. F.; VAZ, B. dos S. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824). R. Bras. Agrobiologia, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 453-460, 2006.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: Baldisserotto, B.; Gomes L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, p. 23-33, 2005.

DAVIDSON, G.W.; et al. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with Aqui-Sk. **J. World Aquac. Soc.** V. 31 n. 1, p.105– 114, 2000.

DIEMER, O; NEU, D. H.; BITTENCOURT, F.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Eugenol como anestésico para jundiá (*Rhamdia voulezi*) em diferentes pesos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 1495-1500, 2012.

DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226746.pdf>. Acesso em 17 de junho de 2014.

EPA Probit Analysis Program Used for Calculating LC/EC Values Version 1.5 Available from: <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2/probit.zip>

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 Sci. Anim. Sci.**, v.30, p.339-344, 2008.

GRUSH, J.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, New Rochele, v. 1, n. 1, 2004.

GUEDES, D. S.; **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, 1980.

HUBBELL, J.A.E.; MUIR, W.W.; SKARDA, R. Anesthetic procedures and techniques in birds, fish, reptiles, amphibians, rodents and exotic cats. In: MUIR, W. W.; HUBBELL, J. A. E. **Handbook of veterinary anesthesia**. St Louis: Mosby. 1989. p. 234-259.

HYAMS, D.G. Curve expert Professional: a comprehensive data analysis software system for Windows. Copyright(C). 2011-2013.

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

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anesthetics in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566. 2003.

MARKING, L.L.; MEYER, F.P.; Are better anaesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2-5. 1985.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p.231-238, 2003.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA). Estatística da Pesca e Aquicultura 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura> Acesso em: 04 março de 2014.

NOCHETTO, C.B. et al. Determination of tricaine residues in fish by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 1241-1248. 2009.

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

PARK, M.O. et al. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884. 2008

RIBEIRO, P. A. P.; MIRANDA FILHO, K. C.; MELILLO FILHO, R.; SANTOS, A. E. H.; SILVA, W. de S. e; RODRIGUES, L. A.; LUZ, R. K. Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.1136-1139, 2013.

ROSS, L.G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, **Blackwell Science Ltd**, Oxford, UK. 159p. 1999.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. Oxford: Blackwell Science, 240 p, 2008.

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

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

SILVEIRA, F. S.; SILVA, F. M.; GRAEFF, A. Desempenho da piscicultura catarinense em 2011. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 133, p. 63-64, 2012.

SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.S. Anaesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. (Eds.). **Methods for Fish Biology**. American Fisheries Society: Bethesda, p. 213-27, 1990.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIAČKOVÁ, V. Effects of clove oil on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria BRNO**, v.74, p.139-146, 2005a.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIAČKOVÁ, V.; GROCH, L.; NEPEJHALOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinární Medicína**, v.50, p.269-275, 2005b.

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

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

VIDAL L.V.O.; FURUYA, W. M.; GRACIANO, .T S.; SCHAMBER, C. R.; SILVA, L. C. R.; SANTOS, L. D.; de SOUZA, S. R. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.8, n.4, p.335-342, 2007b.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C.L.; de LIRA, A. D.; de ALMEIDA, T. R.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, 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.

WEINGARTNER, M.; BEUX, L.F.; FRACALOSI, D.M.; NUÑER, A.P.O.; ZANIBONI-FILHO, E. Desenvolvimento de tecnologias de cultivo para peixes nativos do alto rio Uruguai. In: ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. (Org.) **Reservatório de Itá: Estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna**. Florianópolis. p. 257-309. 2008

WOOSLEY, J. et al. Effect of temperature on clove oil anesthesia in Steelhead fry. *North Am. J. Aquacult.*, Bethesda, v. 66, p. 35-41, 2004.

ZANIBONI-FILHO, E. et al. **Catálogo ilustrado dos peixes do alto rio Uruguai**. Florianópolis: Ed. UFSC/Tractebel Energia, 128p., 2004.