

ANESTESIA POR MEIO DE ASPERSÃO NAS BRÂNQUIAS DE TAMBAQUI NÃO INFLUENCIA A INTENSIDADE E A MORFOLOGIA DE MONOGENÉTICOS

Rodrigo Yudi FUJIMOTO¹, Patricia Oliveira MACIEL², Cheila BOIJINK³, Marcos Tavares DIAS⁴, Marina Keiko IWASHITA², Daniel Massato Vital HIDE⁵, Natalino da Costa SOUZA⁶, Marcia Valéria Silva do COUTO⁶, Juliana Oliveira MENESES⁵, Fernanda dos Santos CUNHA⁵

¹ Embrapa Tabuleiros Costeiros, ² Embrapa Pesca e aquicultura, ³ Embrapa Amazônia Ocidental, ⁴ Embrapa Amapá, ⁵ Universidade Tiradentes, ⁶ Universidade Federal do Pará. E-mail: rodrigo.fujimoto@embrapa.br

RESUMO

Objetivo: O trabalho teve como objetivo avaliar a influência da anestesia com uso de aspersão de óleo de cravo diretamente nas brânquias sobre a fauna de parasitos monogenéticos, quanto sua viabilidade e quantidade. **Metodologia:** Para tanto foi confeccionada uma solução mãe contendo 1 ml de óleo de cravo: 20 ml de álcool: 450 ml de água que foi aspergida na brânquia em apenas um dos lados (esquerdo) (4 aspergidas no total de 2 ml). O lado direito da brânquia foi considerado como controle. Os peixes (n=10) utilizados para esse ensaio foram tambaquís (*Colossoma macropomum*) de peso aproximado de 200g que tiveram tempo de indução de 40 segundos. Após perda de batimento opercular os animais foram eutanasiados e as brânquias do lado direito e esquerdo foram retiradas e um pequeno fragmento fixado em formol 10% para histologia. Do restante das brânquias, os monogenéticos foram contabilizados e coletados. Os monogenéticos coletados foram examinados quanto a sua mobilidade e a viabilidade analisada por meio de fluorescência. **Resultados:** Observaram-se poucos resíduos da aspersão nas brânquias não tendo sido encontrados monogenéticos. Os monogenéticos retirados das brânquias aspergidas com óleo apresentaram motilidade e viabilidade normais. **Conclusão:** Devido a pouca quantidade de anestésico e tempo de indução, não houve diferenças entre o lado esquerdo e direito das brânquias, demonstrando assim que a aspersão de óleo de cravo nas brânquias pode ser utilizada dentro do preceito de abate humanitário sem prejuízos aos estudos parasitológicos.

PALAVRAS-CHAVE: abate humanitário, bem estar animal, parasitologia

ANESTHESIA BY SPRINKLER METHOD IN TAMBAQUI NOT INFLUENCE THE INTENSITY AND THE MORPHOLOGY OF MONOGENEANS

ABSTRACT

Objective: The study evaluated the use of clove oil sprinkled directly in the gills to assess the viability and quantity of monogeneans parasitic fauna. **Methodology:** For this purpose a stock solution containing 1 ml of clove oil: 20 ml of alcohol: 450 ml of water was prepared and then sprinkled on the left gills (4 applications in total 2 ml). The right gill was

considered as control. The tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) (n=10) weighting 200g were used and the anesthetic induction time was 40 seconds. The fish were euthanized after deep anesthesia and the right and left gills were removed and a small fragment fixed in 10% formalin for histology. The rest of the gills, the monogeneans were recorded and collected. The monogeneans were examined for their mobility and viability analyzed by fluorescence. **Results:** None monogeneans were observed in the few residues after spraying. The parasites from gills anesthetic sprinkled showed normal motility and viability. **Conclusion:** Due to small amount of oil, induction time, there were no differences between the left and right side of the gills parasitic fauna, then the use of clove oil sprays in the gills, it can be used within the precept of humane slaughter without changes in the parasitological studies.

KEY WORDS: animal welfare, human slaughter, parasitology

INTRODUÇÃO

Os anestésicos são utilizados nas práticas aquícolas de produção, ensino e pesquisa para promover redução do estresse dos peixes em práticas de manejo, reduzir reação a estímulos durante coleta de material biológico e mesmo para promover insensibilização prévia à eutanásia (ROSS; ROSS, 1999; ROUBACH *et al.*, 2005; CONCEA, 2013). No Brasil, os principais agentes anestésicos comumente utilizados em peixes são a benzocaína (cloridrato de benzocaína) e o eugenol (óleo de cravo).

Recentemente foi demonstrada a atividade anti-helmíntica do eugenol contra parasitas branquiais monogenéticos das brânquias de tambaquis (BOIJINK *et al.*, 2015), evidenciando a possibilidade de interferência de anestésicos nos estudos com ectoparasitas.

Assim, alternativas que atendam aos preceitos de abate humanitário, mas sem interferir em alterações da fauna ectoparasitária, bem como a morfologia dos parasitas, são importantes para viabilizar estudos dessa natureza em peixes. Assim, a discussão ética é importante, e são necessárias informações concretas para agregar conhecimentos que subsidiem e adequem o enquadramento das questões levantadas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a interferência do uso do anestésico eugenol, pelo método de aspersão nas brânquias de tambaqui, nos estudos parasitológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez peixes ($269,0 \pm 49,5$ g; $22,75 \pm 2,75$ cm) foram submetidos à anestesia por eugenol, (1 ml de óleo de cravo + 20 ml de álcool + 450 ml de água) por meio de aspersão

do lado esquerdo da brânquia totalizando 2ml de aspergido. O óleo de cravo foi obtido em solução comercial e diluído em etanol 95% (adaptado de HONCZARYCK; INOUE, 2009).

Para a aspensão nas brânquias, a solução anestésica foi armazenada em aspersores de polietileno, e aproximadamente 2 ml por peixe foi aspergido nas brânquias. Com os animais em decúbito lateral, a aplicação foi realizada, por meio da abertura manual do opérculo. Os animais estavam insensibilizados após 40 segundos, quando se observou parada dos batimentos operculares.

Os animais após anestesia foram eutanasiados por secção da medula para coleta das brânquias. As brânquias foram removidas e separadas em placas de Petri em lado esquerdo (com anestésico) e lado direito (sem anestésico, controle). De cada lado foi retirado um fragmento das brânquias para fixação em formol 10% tamponado para preparação histológica, segundo Behmer *et al.* (1976). O restante das brânquias foi fixada em formol 5% para a contagem dos monogénéticos com auxílio de estereomicroscópio para cálculo da intensidade média.

Na presença de possível conteúdo de líquido residual emanado das brânquias após aspensão, este também foi coletado para verificação da presença de parasitas.

Imediatamente após a coleta 20 parasitas monogénéticos de cada lado das brânquias foram separados para avaliação da motilidade. Esses mesmos parasitas também foram submetidos à avaliação de viabilidade pelo método de fluorescência adaptado de Maria *et al.* (2010) com os fluorocromos SYBR-14 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho). Como controle negativo utilizou-se monogénéticos vivos sem aplicação de eugenol, e, como controle positivo, monogénéticos mortos por aplicação de ácido acético glacial 2,5%.

Os parasitos foram selecionados para identificação pelo método de coloração com Tricrômico de Gomori e Solução de Hoyers .

Os dados da contagem dos monogénéticos (lado esquerdo e direito) foram comparadas por teste T pareado e nas demais análises utilizou-se estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença na intensidade de monogénéticos nas brânquias entre o lado que recebeu aspensão com anestésico eugenol (158 ± 122) e o lado controle (177 ± 119) ($p=0,47$). Foram coletados líquidos residuais somente em duas amostras, e nessas não foram encontrados parasitas após aplicação do anestésico. O procedimento com o

anestésico eugenol não interferiu na morfologia dos parasitas, permitindo sua identificação como sendo *Anacanthorus spathulatus* e *Notozothecium janauachensis*.

Todos os parasitas de ambos os lados das brânquias se mostraram viáveis e com motilidade normal, de acordo com as análises diretas em estereomicroscópio. Na análise por fluorescência, não foram observadas alterações de integridade na superfície do corpo dos parasitas, sendo isso marcado pela emissão de fluorescência verde.

Morfologicamente, as brânquias com aplicação da solução anestésica apresentaram um aumento na quantidade de edemas na lamela secundária em relação ao seu lado controle, assim como hiperplasia das células basais. Contudo em nenhum tratamento foram observados pontos de necrose.

Embora Boijink *et al.* (2015) tenham verificado a ação anti-helmíntica do eugenol administrado na forma de banhos, observamos que a anestesia pelo método de aspersão do eugenol preservou o número de parasitos das brânquias dos peixes.

O método de aspersão dos anestésicos nas brânquias foi eficaz e promoveu a anestesia com total parada dos batimentos operculares dos tambaquis em 40 segundos, seguindo as observações comportamentais de Honczaryck e Inoue (2009) para anestesia por imersão. A via de administração de aspersão do anestésico nas brânquias foi testada em pirarucus demonstrando ser viável nas concentrações de 30 e 60 mg de eugenol L⁻¹ (HONCZARYCK; INOUE, 2009). É provável que o contato direto do anestésico nas brânquias tenha proporcionado satisfatória absorção. Trabalhos que abordam métodos de anestesia associados aos estudos de contagem de parasitas são inexistentes, o que limita a discussão desta temática.

Os métodos que empregam corantes fluorescentes ampliam a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos organismos observados (ARRUDA *et al.*, 2011). Este foi o primeiro estudo que utilizou a fluorescência para avaliar condições morfológicas de monogênicos após exposição a um produto químico, neste caso o anestésico eugenol. De acordo com os resultados, o eugenol na concentração testada pelo método de aspersão não promove alterações morfológicas que comprometam a identificação dos parasitas.

As alterações observadas nas brânquias, edema e hiperplasia, são resultados do contato direto com a solução anestésica eugenol/álcool, que tem como objetivo aumentar a

distância de difusão entre o poluente e o sangue (MOVAHEDINIA *et al.*, 2012) e foram consideradas transitórias em função do contato com o anestésico.

CONCLUSÃO

O método de anestesia por aspersão nas brânquias preservaram a intensidade e morfologia dos monogenéticos das brânquias dos peixes. A anestesia por aspersão em tambaquis é viável estando de acordo com os preceitos de ética animal, sem comprometimento dos resultados em estudos de monogenéticos nas brânquias.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. (Eds.). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, 1976. 256p.
- BOIJINK, C. L.; MIRANDA, W. S. C.; CHAGAS, E. C.; DAIRIKI, J. K.; INOUE, L. A. K. A. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture*, v.438, n. 2015, p. 138–140, 2015.
- CONCEA. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasília, DF, 2013. 54p.
- HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. *Ciência Rural*, v. 39, n. 2, p. 577-579, 2009.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, n. 5, p. 779–783, 2010.
- MOVAHEDINIA, A.; ABTAHI, B.; BAHMANI, M. Gill histopathological lesions of the Sturgeons. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 7, p. 710-717, 2012.
- ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, v. 36, p. 1.056-1.061, 2005.
- ROSS L.G.; ROSS B. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. Blackwell Science, Oxford, UK, 1999.