

Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp.

Hamilton Hisano^{1*}, Márcia Mayumi Ishikawa¹, Rosana de Ávila Ferreira¹, André Luiz Azambuja Bulgarelli², Thiago Raphael Costa² e Santiago Benites de Pádua³

¹Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163, km 253,6, Cx. Postal 661, 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. ²Centro Universitário da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. ³Faculdades Anhanguera Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: hhisano@cpao.embrapa.br

RESUMO. O presente estudo avaliou o óleo de cravo como anestésico para juvenis de dourado em cinco diferentes concentrações (20, 30, 40, 50 e 60 mg L⁻¹), utilizando como critério para determinação da concentração ideal os tempos de indução e de recuperação ao efeito do anestésico. Em relação aos tempos de indução, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de 20, 30, 40 e 60 mg L⁻¹ de óleo de cravo. No entanto, a concentração de 50 mg L⁻¹ não diferiu estatisticamente dos níveis de 40 e 60 mg L⁻¹. Quanto à recuperação, o menor tempo foi verificado para a concentração de 20 mg L⁻¹. O óleo de cravo é eficiente e seguro como anestésico para juvenis de dourado, quando utilizado entre 40 a 60 mg L⁻¹.

Palavras-chave: eugenol, espécie nativa, juvenis, *Salminus brasiliensis*.

ABSTRACT. Induction and recovery time for dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) submitted to different concentrations of clove oil *Eugenia* sp. The present study evaluated five different concentrations (20, 30, 40, 50 and 60 mg L⁻¹) of clove oil as an anesthetic for dourado juveniles, using induction and recovery time to determine the ideal concentration. Significant difference ($p < 0.05$) was observed among 20, 30, 40 and 60 mg L⁻¹ levels of clove oil. However, 50 mg L⁻¹ concentration did not show significant difference in comparison to 40 and 60 mg L⁻¹. Regarding recovery time, the shortest time was verified in the concentration of 20 mg L⁻¹. Clove oil is effective and safe as an anesthetic for dourado juveniles in levels between 40 and 60 mg L⁻¹.

Key words: eugenol, native species, juveniles, *Salminus brasiliensis*.

Introdução

O dourado (*Salminus brasiliensis*) é um Characiforme carnívoro de hábito diurno, de coloração típica amarelo-dourado (Braga *et al.*, 2007), encontrado na bacia do Prata, formada pelos rios Paraguai, Paraná e Uruguai, e na bacia do rio São Francisco (Zaniboni-Filho, 2004).

É um peixe de grande porte, com excelente qualidade organoléptica, elevado preço de mercado e, além disso, apresenta esportividade e agressividade, que o tornam excelente atrativo em estabelecimentos de pesque-pague (Weingartner e Zaniboni-Filho, 2005).

Apesar do potencial de criação dessa espécie, alguns entraves dificultam sua produção em escala comercial, entre os quais se destacam o difícil manejo, baixas taxas de fertilização e elevado canibalismo durante a fase inicial (Ribeiro, 2005). Em função do comportamento agressivo do

dourado, é recomendável o uso de anestésico durante o seu manejo, no sentido de minimizar os efeitos do estresse.

Alguns produtos químicos, como a triclaína metanossulfato (MS-222), sulfato de quinaldina, fenoxietanol e benzocaína, são comumente utilizados como anestésicos para peixes (Inoue *et al.*, 2003). O MS-222 é um dos poucos anestésicos liberados para o uso em peixes destinados ao consumo humano nos Estados Unidos (Wagner *et al.*, 2002). É efetivo e extremamente solúvel em água, no entanto, apresenta alto custo e acidez elevada, podendo abaixar consideravelmente o pH da água (Sladky *et al.*, 2001).

A quinaldina é um óleo amarelo com limitada solubilidade na água e, em pH baixo, perde sua eficiência. O fenoxietanol é um óleo com odor aromático que, além de anestésico, é também fungicida e bactericida, porém, é um produto de

difícil acesso e custo elevado (Roubach e Gomes, 2001). A benzocaína se destaca pelo seu preço acessível, facilidade e segurança para o manejo, sendo o anestésico mais utilizado para peixes no Brasil (Gomes et al., 2001).

Entretanto, a utilização de anestésicos sintéticos tende a causar efeitos adversos nos peixes, tais como perda de muco, irritação das brânquias e danos na córnea (Inoue et al., 2003). A benzocaína e o MS-222, por exemplo, são derivados do ácido p-aminobenzoico e, por isso, provocam redução da ventilação nas brânquias pela depressão dos centros medulares respiratórios, tendo a hipóxia como consequência (Delbon, 2006).

Dessa forma, como anestésico alternativo, destaca-se o óleo de cravo por ser um produto natural, efetivo, de baixo custo, seguro e de fácil acesso (Keene e Noakes, 1998; Sladky et al., 2001; Inoue et al., 2003). Esse óleo tem como princípio ativo o composto fenólico eugenol (4-alil-2-metoxifenol- $C_{10}H_{12}O_2$), derivado do caule, flores e folhas das árvores *Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica* (Griffiths, 2000).

O óleo de cravo, em comparação com outros anestésicos, aparenta ser mais prático a campo e em algumas operações no laboratório, uma vez que tem a capacidade de imobilizar os peixes rapidamente, quando utilizado em baixas concentrações (Munday e Wilson, 1997; Cho e Heat, 2000; Inoue, 2005). Outra vantagem deste fármaco é a sua rápida metabolização e excreção pelos peixes, não exigindo tempo de carência quando estes são destinados ao consumo humano (Waterstrat, 1999; Cho e Heat, 2000).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação do óleo de cravo como anestésico em juvenis de dourado, utilizando o tempo de indução e de recuperação anestésica para a identificação da concentração ideal.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Piscicultura da *Embrapa Agropecuária Oeste*, Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul. Antecedendo o período experimental, 50 juvenis de dourado foram previamente alojados e aclimatados, durante 15 dias, em tanque circular de 1000 L, com fluxo contínuo de água proveniente de poço artesiano (10 L min⁻¹). Os peixes foram alimentados com ração comercial para carnívoros (45% PB - 4 mm), que foi fornecida em duas parcelas ao dia.

Durante esse período, a temperatura da água e o oxigênio foram aferidos diariamente, com oxímetro/termômetro modelo YSI® 55. Semanalmente,

foi realizada a limpeza do tanque de manutenção, por meio de sifonagem para a retirada de eventuais resíduos orgânicos (fezes e sobras de ração).

Para avaliação dos anestésicos, foram utilizados cinco recipientes plásticos com volume útil de 15 L de água, com temperatura média e oxigênio dissolvido de $21,6 \pm 0,73^\circ\text{C}$ e $6,9 \pm 0,33 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A água utilizada foi a mesma dos tanques de aclimação e renovada em cada teste de concentração, no sentido de evitar possíveis concentrações residuais.

Os peixes foram, individualmente, expostos às concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60 mg L⁻¹ de óleo de cravo. Em função da insolubilidade do anestésico na água, foi preparada uma solução alcoólica estoque contendo álcool etílico (PA 95%) e óleo de cravo comercial em diluição de 1:20 (v/v). Para determinação da concentração de óleo de cravo na solução estoque, foi medida sua densidade ($1,043 \pm 0,001$).

A observação dos estágios de anestesia foi baseada em critérios estabelecidos por Woody et al. (2002), que descrevem quatro estágios de anestesia: primeiro estágio (diminuição visível dos movimentos operculares), segundo estágio (perda parcial de equilíbrio e dificuldade em manter a posição normal de nado), terceiro estágio (perda total do equilíbrio e incapacidade de retornar a posição normal de nado) e quarto estágio (mínimo movimento opercular com comportamento estático).

Durante a exposição ao anestésico, foi registrado o tempo de indução ao terceiro estágio de anestesia, utilizando cronômetro digital. Após atingir esse estágio, os peixes foram retirados dos recipientes plásticos para serem medidos (comprimento total) e pesados.

Posteriormente ao período de exposição às diferentes concentrações de óleo de cravo e biometria, os peixes foram alojados em recipiente plástico com volume útil de 15 L, com água proveniente dos tanques de aclimação e com aeração constante, para facilitar a visualização dos sinais comportamentais característicos de recuperação determinados por Woody et al. (2002), que consideram este estágio quando os peixes restabelecem o equilíbrio corporal e começam a nadar horizontalmente. Foi registrado o tempo de recuperação para posterior análise da concentração ideal.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições (peixes). Os tempos de indução e de recuperação foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, foi aplicado o teste de comparação de médias de Tukey, complementada com a análise de regressão polinomial para o tempo de indução.

Resultados e discussão

Todos os peixes expostos às concentrações de óleo de cravo (20, 30, 40, 50 e 60 mg L⁻¹) atingiram o terceiro estágio de anestesia, caracterizado pela perda total do equilíbrio e da capacidade de não restabelecer a posição normal de nado.

Em relação aos tempos de indução (Tabela 1), verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de 20, 30, 40 e 60 mg L⁻¹ de óleo de cravo; no entanto, a concentração de 50 mg L⁻¹ não diferiu estatisticamente entre os níveis de 40 e 60 mg L⁻¹, por meio da análise de regressão, representada pela equação $\hat{y} = 0,3547x^2 - 43,307x + 1406,6$ ($R^2 = 0,9802$), com a concentração ótima estimada em 61 mg L⁻¹, considerando o menor tempo de indução (Figura 1).

Tabela 1. Tempos de indução e de recuperação à anestesia e tamanho corporal de juvenis de dourado expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo.

Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo de indução (s)	Tempo de recuperação (s)	Peso (g)	Comprimento Total (cm)
20	664,80 ± 72,33 a	146,40 ± 25,10 b	21,71 ± 2,60	13,56 ± 0,57
30	476,60 ± 40,13 b	267,80 ± 67,66 a	22,93 ± 2,31	13,80 ± 0,44
40	197,60 ± 51,90 c	224,60 ± 17,26 ab	21,51 ± 3,35	13,32 ± 0,55
50	137,20 ± 49,36 cd	286,40 ± 50,87 a	20,88 ± 2,94	13,20 ± 0,62
60	88,00 ± 15,81 d	217,20 ± 49,16 ab	20,09 ± 2,58	13,28 ± 0,57

Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

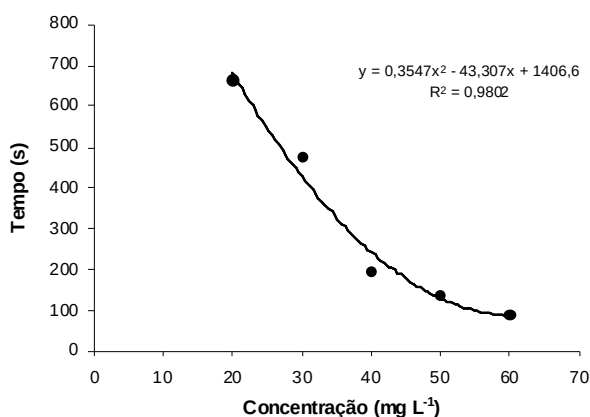


Figura 1. Tempo de indução à anestesia de juvenis de dourados expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo.

Nesse sentido, Walsh e Pease (2002), avaliando a eficácia do óleo de cravo como anestésicos em enguias (*Anguilla reinhardtii*), também observaram que o aumento na concentração do óleo de cravo durante a anestesia reduziu o tempo de indução. Comparando as concentrações testadas de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 mg L⁻¹, esta última foi a que proporcionou o menor tempo de indução ($2,7 \pm 0,3$ min.), com temperatura da água de 25°C.

As menores dosagens de óleo de cravo tendem a

aumentar o tempo de indução, o que foi observado no presente experimento e confirmado por Soto e Burhanuddin (1995) que, ao induzirem exemplares de *rabbitfish* (*Siganus lineatus*) à anestesia com óleo de cravo em concentrações de 33, 50, 67 e 100 mg L⁻¹, relataram que a de 33 mg L⁻¹ correspondeu ao maior tempo de indução (150 a 190 s). Da mesma forma, Cunha e Rosa (2006), estudando o mesmo anestésico em diferentes espécies de peixes tropicais, também observaram que a menor concentração testada (20 mg L⁻¹) proporcionou o maior tempo de indução (127,33 s).

Por outro lado, Inoue *et al.* (2003) observaram não haver diferença estatística quanto ao tempo de indução para concentrações acima de 40 mg L⁻¹, em estudo com diferentes concentrações de óleo de cravo (18, 20, 30, 40, 50 e 60 mg L⁻¹) para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). Tort *et al.* (2002), por sua vez, verificaram que o tempo de indução foi semelhante (1-3 min.) para todas as concentrações de óleo de cravo testadas (0,05-0,2 mL L⁻¹) em dourada (*Sparus aurata*) e em truta (*Ocorhynchus mykiss*).

Quanto ao tempo de recuperação, as concentrações de 30 e 50 mg L⁻¹ diferiram significativamente ($p < 0,05$) da concentração de 20 mg L⁻¹, porém, foram equivalentes entre si, enquanto as concentrações de 40 e 60 mg L⁻¹ não diferiram das demais. O menor tempo de recuperação foi o verificado para 20 mg L⁻¹; no entanto, essa concentração proporcionou o maior tempo de indução.

Delbon (2006), em estudo para avaliar a concentração ideal do óleo de cravo em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), não observou diferença estatística para o tempo de recuperação entre as concentrações de 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹, porém, o tempo de recuperação para a concentração de 120 mg L⁻¹ foi superior às demais, com o maior tempo de recuperação ($25,4 \pm 4,83$ min.). Woody *et al.* (2002), ao testarem o efeito anestésico do óleo de cravo para salmão (*Oncorhynchus nerka*), observaram diferença estatística quanto ao tempo de recuperação na concentração de 140 mg L⁻¹ em relação às de 20 e 50 mg L⁻¹.

De acordo com Cunha e Rosa (2006), é necessário atenção quando são aplicadas altas dosagens de óleo de cravo, devendo-se observar previamente a espécie utilizada e o tamanho do peixe. Dessa forma, Sladky *et al.* (2001) relataram que pirapitingas (*Piaractus brachyomus*) expostas a 200 mg L⁻¹ de eugenol não foram capazes de se recuperar completamente durante os 10 min. estabelecidos para esse tipo de observação. Segundo

os autores, peixes expostos a altas concentrações de eugenol (100 ou 200 mg L⁻¹) devem ser monitorados, pois podem ocorrer deficiências respiratórias e colapsos medulares, o que pode ocasionar mortalidade.

Waterstrat (1999), ao expor alevinos de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) a concentrações superiores a 100 mg L⁻¹ de óleo de cravo, por um período de 10 min., não observou casos de mortalidade, embora o tempo de recuperação tenha sido superior ao recomendável (5 min.). No entanto, ao utilizar a concentração de 300 mg L⁻¹, durante o mesmo período de tempo, o autor constatou mortalidade de 50% dos alevinos. Foram testados ainda, no mesmo trabalho, diferentes tempos de exposição dos peixes na concentração de 100 mg L⁻¹ e foi constatado que a exposição ao óleo de cravo igual ou superior a 20 min. levou à mortalidade de, pelo menos, 20% dos alevinos.

Com relação ao fato de diferentes espécies apresentarem tempos de indução e de recuperação por vezes semelhantes ou diferentes quando expostas a um mesmo anestésico, Mylonas et al. (2005) submeteram as espécies lubina (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*S. aurata*) a solução anestésica com 40 mg L⁻¹ de óleo de cravo durante 5, 10 e 15 min. Os autores verificaram que, conforme aumentou o tempo de exposição ao anestésico, o período de recuperação foi maior para dourada em relação à lubina. Além disso, houve alta mortalidade de douradas quando estes ficaram em contato com o anestésico durante o período de 10 min. ou mais.

No presente estudo, não foi verificado mortalidade durante a exposição dos juvenis de dourado às diferentes concentrações de óleo de cravo. No entanto, quando os peixes foram submetidos à concentração de 60 mg L⁻¹, observou-se mudança brusca de comportamento, evidenciada pela rápida movimentação dos peixes, com súbito sintoma de perda de equilíbrio. Em função do comportamento apresentado pelos peixes, quando submetidos a esta dosagem, seriam oportunas novas avaliações com concentrações e tempos de indução superiores ao do estudo, que foi entre 2 a 3 min., caracterizando manejo básico de biometria em laboratório. Vidal et al. (2006) também descreveram comportamento semelhante ao testar o óleo de cravo em juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), com peso médio de 27,76 ± 7,7 g. Segundo o autor, há a possibilidade dessas reações adversas ocorrerem pelo próprio eugenol.

De acordo com Inoue (2005), as visíveis alterações na frequência dos batimentos operculares e a intensa movimentação que os peixes realizam nos

primeiros instantes do banho anestésico caracterizam sinais de alterações cardiopulmonares, os quais devem ser verificados. O autor, ao descrever respostas cardiopulmonares de matrinxãs (76,4 ± 5,5 g) expostos ao eugenol à concentração de 25 mg L⁻¹, observou que este anestésico é satisfatório, embora os peixes tenham apresentado taquicardia e hiperventilação associadas à hipotensão, o que pode ser explicado, provavelmente, pela intensa atividade muscular já nos primeiros instantes de exposição ao anestésico.

A concentração de óleo de cravo mais efetiva neste experimento para juvenis de dourado (21,43 ± 2,7 g), levando em consideração o tempo de indução e de recuperação, esteve numa faixa de 40 a 60 mg L⁻¹, sendo semelhante aos resultados de Delbon (2006), ao observar que as melhores concentrações de óleo de cravo para tilápias estão entre 60-100 mg L⁻¹; e aos de Keene e Noakes (1998), ao concluir que concentrações de 40-60 mg L⁻¹ foram ideais para induzir rapidamente à anestesia, com tempo relativamente curto de recuperação para juvenis de truta.

Agradecimentos

À Técnica do Laboratório de Piscicultura da Embrapa Agropecuária Oeste, Bianca R. F. Tomporoski, pela colaboração na execução do experimento, e ao Sr. Primo José Dambrós, pela doação dos peixes.

Referências

- BRAGA, L.G.T. et al. Trânsito gastrointestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. *Pesq. Agropecu. Bras.*, Brasília, v. 42, n. 1, p. 131-134, 2007.
- CHO, G.K.; HEAT, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac. Res.*, Oxford, v. 31, p. 537-546, 2000.
- CUNHA, F.E.A.; ROSA, I.L. Anesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. *J. Fish Biol.*, London, v. 69, p. 1504-1512, 2006.
- DELBON, M.C. Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*. 2006. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.
- GOMES, L.C. et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquac. Soc.*, Baton Rouge, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001.
- GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.*, London, v. 57, p. 1453-1464, 2000.
- INOUE, L.A.K.A. Respostas do matrinxã (*Brycon cephalus*) a

- anestésicos e estressores. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)–Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- INOUE, L.A.K.A. *et al.* Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciênc. Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G. The efficacy of clove oil as an anesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.*, Oxford, v. 29, p. 89-101, 1998.
- MUNDAY, P.L.; WILSON, S.K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J. Fish Biol.*, London, v. 51, p. 931-938, 1997.
- MYLONAS, C.C. *et al.* Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxylethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 246, p. 467-481, 2005.
- RIBEIRO, D.F.O. *Alimentação de pós-larvas de dourado Salminus brasiliensis (Pisces, Characidae) em viveiros de piscicultura*. 2005. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. *Panor. Aquic.*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.
- SLADKY, K.K. *et al.* Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piractus brachypomus*). *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.
- SOTO, C.G.; BURHANUDDIN. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 136, p. 149-152, 1995.
- TORT, L. *et al.* Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2- phenoxylethanol. *Aquac. Res.*, Oxford, v. 33, p. 907-910, 2002.
- VIDAL, L.V.O. *et al.* Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). *Acta Sci. Biol. Sci.*, Maringá, v. 28, n. 3, p. 275-279, 2006.
- WAGNER, E. *et al.* 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, p. 353-366, 2002.
- WALSH, C.T.; PEASE, B.C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquac. Res.*, Oxford, v. 33, p. 627-635, 2002.
- WATERSTRAT, P.R. Induction and recovery from anaesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. *J. World Aquac. Soc.*, Baton Rouge, v. 30, n. 2, p. 250-255, 1999.
- WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Dourado. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 257-286.
- WOODY, C.A. *et al.* Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J. Fish Biol.*, London, v. 60, p. 340-347, 2002.
- ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C.R. *et al.* (Ed.). *Aqüicultura: experiências brasileiras*. Florianópolis: UFSC, 2004. p. 337-369.

Received on November 28, 2007.

Accepted on June 04, 2008.