

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre  
parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis  
niloticus***

Marina Carvalho Delbon  
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Agosto de 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre  
parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis  
niloticus***

Marina Carvalho Delbon  
Bióloga

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani de Paiva

Dissertação apresentada  
ao Centro de Aquicultura  
da Unesp, sediado no  
Campus de Jaboticabal,  
como parte das  
exigências para obtenção  
do Título de Mestre em  
Aquicultura

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Agosto de 2006

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

## DEDICATÓRIA

Ofereço e dedico este trabalho a meus pais

Aryovaldo e Maria Irene

e a minha irmã e minha avó

Camila e Irene,

Pelo incentivo e apoio.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por dar-me capacidade de realizar meu trabalho.

À minha família, por dar-me apoio em todos os momentos.

Ao CAUNESP e ao Instituto de Pesca/SP, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À prof. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva, pela confiança, orientação, incentivo, serenidade e amizade de todos os momentos.

Ao prof. Dr. Fábio Futema, pela escolha do tema e orientação do trabalho.

À todos os professores do CAUNESP, pelos ensinamentos.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca, pelo apoio e auxílio no preparo do trabalho.

Ao doutorando Nilton Ishikawa, pela doação de juvenis de tilápia.

Aos estagiários do Instituto de Pesca: Danielle, Fernanda, Flávia, Guilherme, Natália, Patrícia, Robson e Silvia, pela ajuda concedida durante todo o experimento.

Às amigas de Jaboticabal: Claire, Danielle, Michele, Solange, Valeska e muitas outras, pela amizade durante a pós-graduação.

À amiga de infância Camila, à “irmã” da graduação Luciana, minha prima Luisa e meu namorado Felipe, pelos conselhos transmitidos durante este trabalho.

À Capes, pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE QUADRO.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.2.1 Estresse em peixes.....	15
1.2.2 Benzocaína.....	18
1.2.3 Óleo de cravo.....	19
2. OBJETIVO.....	21
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	22
3.1 Tempo de indução e de recuperação anestésica.....	22
3.2 Monitoramento cardíaco.....	24
3.3 Análises fisiológicas e tempo de retorno à alimentação.....	24
3.4 Análises estatísticas.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Tempo de indução e de recuperação anestésica.....	30
4.2 Monitoramento cardíaco.....	39
4.3 Análises fisiológicas e tempo de retorno à alimentação.....	44
5. CONCLUSÃO.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

**LISTA DE TABELAS**

	Página
1. Ingredientes utilizados para as concentrações anestésicas e pesos médios de tilápias ( <i>O. niloticus</i> ) testadas.....	23
2. Resultados dos tempos de indução e de recuperação dos dois anestésicos testados em <i>O. niloticus</i> , nas concentrações utilizadas.....	30
3. Frequência cardíaca e número de movimentos operculares/minuto de tilápia anestesiada com óleo de cravo.....	40
4. Médias dos tempos de indução e de recuperação de <i>O. niloticus</i> anestesiada com óleo de cravo e benzocaína, em duas temperaturas.....	46
5. Média dos valores de cortisol e glicose dos peixes do grupo controle e daqueles tratados com óleo de cravo e benzocaína, à 23°C e à 28°C.....	48
6. Valores médios e erro padrão dos parâmetros do eritrograma de <i>O. niloticus</i> anestesiada com óleo de cravo, benzocaína e não anestesiada (controle), à 23°C e à 28°C.....	52
7. Valores médios e erro padrão dos trombogramas dos peixes anestesiados com óleo de cravo, benzocaína e não anestesiados (controle), à 23°C e à 28°C...	58
8. Valores totais dos diferentes leucócitos observados nas extensões sanguíneas	61

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Juvenil de <i>O. niloticus</i> com eletrodos fixados em seu corpo para posterior mensuração da frequência cardíaca.....	25
2. Leitura da frequência cardíaca pela cardioscopia.....	25
3. Média dos tempos de indução e de recuperação, em minutos, de óleo de cravo, nas concentrações testadas em <i>O. niloticus</i> .....	37
4. Média dos tempos de indução e de recuperação, em minutos, de benzocaína, nas concentrações testadas em <i>O. niloticus</i> .....	37
5. Perfil dos movimentos operculares nas duas concentrações de óleo de cravo em tilápia, <i>O. niloticus</i> .....	41
6. Perfil da frequência cardíaca nas duas concentrações de óleo de cravo em tilápia, <i>O. niloticus</i> .....	41
7. Média das taxas de alimentação (%) de <i>O. niloticus</i> , submetido à anestesia por benzocaína e óleo de cravo, além do grupo controle, em diferentes temperaturas.....	69

## LISTA DE QUADRO

	Página
1. Estágios anestésicos da anestesia, segundo ROUBACH & GOMES,(2001)	23



## RESUMO

Avaliou-se as concentrações ideais e os tempos de indução e de recuperação do anestésico benzocaína e óleo de cravo, em juvenis de *Oreochromis niloticus*. Para isso, testou-se cinco concentrações de óleo de cravo e três de benzocaína e, com as análises de frequência cardíaca, determinou-se que 100 mg/L de benzocaína e 80 mg/L de óleo de cravo foram as concentrações mais eficazes para estes organismos-teste. A partir destas determinações, montou-se um experimento onde foram analisadas alterações fisiológicas (cortisol, glicose, hematócrito, hemoglobina, número total de células sanguíneas, VCM, HCM, CHCM, contagem total de trombócitos e contagem total e diferencial de leucócitos), a 23°C e a 28°C, e o tempo que os peixes levaram para se alimentar após o tratamento anestésico. Com estas análises, concluiu-se que os anestésicos testados minimizaram o efeito do estresse causado por manipulações e procedimentos invasivos, e que os peixes submetidos ao tratamento com óleo de cravo, apesar de não ser significativo, apresentaram maiores taxas de alimentação, em relação aos demais tratamentos.

Palavras-chave: benzocaína, estresse, frequência cardíaca, óleo de cravo, *Oreochromis niloticus*, peixes.

## ABSTRACT

The ideal concentrations, induction and recovery time after treatment with benzocaine anaesthetic and clove oil, in juvenile of *Oreochromis niloticus* has been evaluated. Five concentrations of clove oil and three of benzocaine were tested. Through the analyses of cardiac frequency, it was show that 100 mg/L of benzocaine and 80 mg/L of clove oil showed the most efficient concentrations for this test organism. Further, an experiment where physiological alterations (cortisol, glucose, hematocrit, hemoglobin, total number of cells, MCV, MCH, MCHC, total counting of trombocytes and total and differential countings of leukocytes), at 23°C and 28°C was conducted, as well as the time that the fish fed after anaesthetic treatment. It was concluded that the tested anaesthetics minimized the stress effects caused by manipulations and invasive procedures, and that the fish submitted to the treatment with clove oil, although not significant, presented higher feeding rates, in relation to the other treatments.

Key-words: benzocaine, clove oil, stress, fish, heart rate, *Oreochromis niloticus*

## 1. INTRODUÇÃO

Na aquicultura e em trabalhos experimentais com peixes, os anestésicos são utilizados para reduzir a atividade dos animais durante o transporte, pesagem, marcação, além de outras manipulações (McFARLAND, 1960; GUNN, 2000; PIRHONEN & SCHRECK, 2002).

A escolha do anestésico para peixes geralmente está relacionada com a viabilidade econômica e considerações legais (IWANA & ACKERMAN, 1994). A redução da atividade, do estímulo visual, do consumo de oxigênio e da excreção de amônia pode ser citada como um dos efeitos positivos da utilização de anestésicos (WURTS, 1995). No entanto, muitos inconvenientes quanto ao uso desses fármacos podem ser observados, como por exemplo, a perda de muco, irritação das brânquias, danos na córnea (INOUE *et al.*, 2003), a redução da proteção do peixe contra patógenos oportunistas e aumento da resposta de estresse (CARNEIRO *et al.*, 2001).

Os anestésicos podem ser injetados no peixe, entretanto a maioria é administrada na água (BOWSER, 2001). Deste modo, o anestésico, através das brânquias e da pele, entra no sistema circulatório do animal, bloqueando algumas ações reflexas (SUMMERFELT & SMITH, 1990). Em ambos os casos, o fármaco deve ser solúvel em água. Entretanto, alguns são primeiramente dissolvidos em um solvente orgânico para depois serem diluídos em água (BOWSER, 2001).

Assim, como a maioria dos anestésicos usados em peixes são absorvidos nos tecidos, via brânquias, estes podem acumular resíduos (MARKING & MEYER, 1985). As brânquias são o principal caminho de entrada e excreção de anestésicos e de ventilação branquial. Por isso, qualquer fator que afete esta ventilação, como a temperatura, por exemplo, pode comprometer a eficácia do anestésico (HIKASA *et al.*,

1986) e também a eliminação de seus resíduos. Para eliminar esses resíduos é necessário que haja depuração. O tempo deste processo depende do tipo da droga utilizada, da espécie alvo, da concentração e da via de administração, que pode ser de algumas horas a várias semanas (BOOTH, 1988). Mesmo que os resíduos anestésicos presentes nos peixes não sejam prejudiciais ao consumo humano, segundo STONE & TOSTIN (1999), estes podem afetar o sabor natural do peixe, quando forem consumidos.

De acordo com SYLVESTER (1975), um anestésico deve apresentar ação rápida sobre o sistema nervoso, sem complicações posteriores para o peixe, além de ser econômico e de fácil manipulação (PIRHONEN & SCHRECK, 2002).

Como cada anestésico exige uma concentração diferente para induzir o estágio anestésico desejado, é necessário testar várias concentrações antes do tratamento definitivo para não causar mortalidade dos animais expostos ao fármaco (ROUBACH & GOMES, 2001).

Segundo GUNN (2000), os salmonídeos requerem uma dose anestésica menor que os demais teleósteos, indivíduos com relação área branquial/peso do corpo elevada têm absorção do fármaco mais eficiente e peixes com aparatos respiratórios acessórios tendem a apresentar indução mais lenta. Ainda, o conteúdo de gordura, o tamanho do corpo, idade e sexo, bem como a temperatura e o pH, influenciam na velocidade de indução e recuperação.

Já foram atribuídos aos peixes vários estágios anestésicos. Geralmente, a maioria deles passa por todas as fases, no entanto, ocorrem variações nas diferentes espécies, no tipo de anestésico empregado e na dose aplicada. Alguns estágios comumente descritos não ocorrem no processo anestésico de certos peixes (BROWN,

1993). Por exemplo, de acordo com ROUBACH & GOMES (2001), para a biometria, o estágio utilizado é a anestesia profunda; já em intervenções cirúrgicas, recomenda-se o estágio de anestesia cirúrgica.

ROUBACH & GOMES (2001) caracterizam seis estágios anestésicos. O estágio 1 é caracterizado por perda de reação aos estímulos visuais e ao toque; o estágio 2 é marcado por perda parcial do equilíbrio; o estágio 3 caracteriza-se pela perda total do equilíbrio; no estágio 4 pela diminuição dos movimentos operculares; o estágio 5 por mínimo movimento opercular, estágio em que o peixe fica estático; e o estágio 6 de anestesia caracteriza-se por colapso medular, em que o peixe perde totalmente os movimentos operculares, seguido de parada cardíaca (MUIR *et al.*, 1995). No entanto, de acordo com BROWN (1993), mesmo quando o peixe perde os movimentos operculares, este quadro pode ser revertido. Para a recuperação do peixe anestesiado que não apresenta movimentos operculares é aplicado procedimento de recuperação forçada. Esse procedimento consta de movimentar a cabeça do peixe contra a água, para que esta possa entrar pela boca e passar através das brânquias, até que seja observada a total recuperação do animal (BROWN, 1993).

Vários estudos mostram a eficácia dos diferentes anestésicos (WEDEMEYER, 1970; YANAR & KUMLU, 2001; HILL *et al.*, 2004; INOUE *et al.*, 2003), seus efeitos fisiológicos (CHO & HEATH, 2000; DAVIDSON *et al.*, 2000; SMALL, 2003; DAVIS & GRIFFIN, 2004), sua ação em diferentes temperaturas (CROUX & MONTAGNA, 1998) e a recuperação dos peixes (FREDRICKS *et al.*, 1993; HILL *et al.*, 2004).

Entretanto, as substâncias químicas amplamente utilizadas para anestésias peixes, como a triclaína metano sulfonato (MS-222), sulfato de quinaldina e fenoxietanol, são tóxicas (ROUBACH *et al.*, 2001).

No Brasil, não existem leis específicas regularizando o uso de tais drogas. Assim, são geralmente seguidas as recomendações do Food and Drug Administration (FDA). O único anestésico aprovado por este órgão é o MS-222, cujo valor comercial é dez vezes maior que o seu similar, a benzocaína (GOMES *et al.*, 2001).

Estudos com juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) concluíram que a benzocaína apresentou os melhores critérios estabelecidos para um anestésico de peixe (GOMES *et al.*, 2001). No entanto, estudos com anestésicos alternativos como o eugenol e seus derivados - óleo de cravo e AQUI-S - são necessários (KEENE *et al.*, 1998; SLADKY *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 2002; IVERSEN *et al.*, 2003). O conteúdo químico principal do óleo de cravo é o eugenol (70-98%) (BRIOZZO *et al.*, 1989; VELOZO, 2002). O eugenol (4-alil-2-metoxifenol - C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) tem múltiplos usos, agindo principalmente como antiséptico, analgésico e anestésico na medicina e na odontologia (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2002).

Diante disso, este trabalho teve o intuito de estudar a ação de dois anestésicos (benzocaína e óleo de cravo) sob duas temperaturas (23°C e 28°C). Para isso, foram analisados seus efeitos hematológicos, fisiológicos e o tempo de indução e de recuperação anestésica sob estas temperaturas. Em relação à recuperação dos peixes ao fármaco, analisou-se também o tempo que cada animal demora a se alimentar após o procedimento anestésico, tendo como base a quantidade de ração ofertada a ele antes do tratamento.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Estresse em peixes

Quando os peixes são submetidos a estressores, diversas alterações são observadas nos parâmetros hematológicos (MORGAN & IWANA, 1997), em respostas a alterações fisiológicas e bioquímicas (ROBERTSON *et al.*, 1988; IWANA *et al.*, 1989; FREDERICKS *et al.*, 1993), como o aumento dos níveis de cortisol, hiperglicemia e imunossupressão (WENDELAAR BONGA, 1997).

Nos parâmetros hematológicos, alterações na taxa de hemoglobina, no hematócrito ou no número de eritrócitos após estresse podem sugerir hemoconcentração ou hemodiluição por disfunção osmorregulatória (HOUSTON *et al.*, 1996). Já, as respostas fisiológicas de estresse variam de acordo com a intensidade do agente estressor, sendo pouco expressivas quando os peixes são expostos a estímulos mais brandos e por rápido período de tempo (ROBERTSON *et al.*, 1988).

Estudos mostram que o principal mecanismo de controle do estresse em peixes é o sistema neuroendócrino, assim como em mamíferos (DONALDSON, 1981; MAZEAUD & MAZEAUD, 1981). Em peixes, um grupamento de células foliculares localizadas na porção anterior dos rins, conhecida como tecido interrenal, possui a mesma função das glândulas adrenais em mamíferos, onde estão localizadas as células cromafins e células interrenais, responsáveis pela liberação de catecolaminas e cortisol, respectivamente (SMITH, 1982).

A elevação dos níveis de catecolaminas, principalmente da adrenalina, ocorre rapidamente após a presença de algum estímulo estressor, atingindo níveis máximos em

segundos e retornando aos níveis iniciais em minutos (MAZEAUD & MAZEAUD, 1981). Os níveis sanguíneos do cortisol, principal corticosteróide liberado na presença de agentes adversos, elevam-se após alguns minutos de exposição do peixe a alguma condição desfavorável, podendo levar horas até atingir o nível máximo (McDONALD & MILLIGAN, 1997).

Sabe-se que a imobilização química ajuda o peixe a minimizar os efeitos causados por procedimentos, como manipulações. Assim, espera-se que peixes submetidos ao processo de anestesia não sofram distúrbios bioquímicos e fisiológicos.

Entretanto, CHO & HEATH (2000), em seus estudos com salmão chinook, *O. tshawytsch*, verificaram que os níveis de depressão do sistema nervoso central atingidos pelos animais submetidos à triclaína ou ao óleo de cravo, não necessariamente mitigaram respostas fisiológicas, especialmente de secreção do cortisol e SOIVIO & NIKINMAA (1981) relataram em truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, aumento do tamanho dos eritrócitos, após estas serem anestesiadas com benzocaína ou MS-222. Portanto, o próprio anestésico pode induzir efeitos indesejáveis, alterando as variáveis bioquímicas (THOMAS, 1991; SLADKY *et al.*, 2001; WOODY *et al.*, 2002).

Por outro lado, HUNN & GREER (1991) reportaram que não houve alteração nos parâmetros de sangue do salmão do Atlântico, *Salmo salar*, após ser anestesiado com triclaína (MS-222) e benzocaína; enquanto ROBERTSON *et al.* (1988) verificaram que peixes transportados com MS-222 não apresentam mudanças nos parâmetros fisiológicos, devido à redução de estresse obtido pelo fármaco.



STRANGE & SCHRECK (1978) notaram efeito benéfico do MS-222 em salmão chinook, *O. tshawytscha*, visto que esta droga evitou elevações nos níveis de cortisol durante o manejo, além de diminuir a amplitude de respostas fisiológicas. Contudo, estes autores notaram pouca eficácia do anestésico em diminuir os níveis plasmáticos do hormônio quando os peixes foram submetidos a baixas concentrações por períodos de tempo mais prolongados.

Segundo SCHRECK (1996), o estresse também afeta a atividade dos leucócitos, facilitando a infestação por parasitas. Ainda, segundo este autor, a mobilização de energia causada pelo estresse afeta negativamente os mecanismos de resistência do peixe, uma vez que estes mecanismos também demandam energia.

A análise dos constituintes sanguíneos fornece informações importantes para o diagnóstico das populações de peixes. As variáveis relativas ao eritrograma são de grande relevância na identificação de processos anemiantes e como indicadores da resposta de estímulos externos. Os níveis eletrolíticos e o leucograma podem ser empregados como auxílio diagnóstico nos processos infecciosos. Assim, é necessário conhecer os valores hematológicos de cada espécie, além de estabelecer suas particularidades (TAVARES-DIAS, 2003; RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

As espécies mais sedentárias são, geralmente, herbívoras, possuem menor número de eritrócitos (MAVAREZ & PÉREZ, 1984; MURARI *et al.*, 1992), menor concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e maior volume corpuscular médio (VCM) (LAY & BALDWIN, 1999).

As tilápias são pertencentes à família Cichlidae, cuja maioria é originária de rios africanos, e está apta a viver e reproduzir em ambiente marinho (HILSDORF,

1995). Foi introduzida no Brasil pelo Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DENOCS), no Ceará, em 1971 (CASTAGNOLLI, 1992). É uma espécie de peixe territorialista, com hierarquia de dominância e submissão estabelecida por confrontos entre os indivíduos. O estabelecimento e a manutenção desta hierarquia provocam, tanto nos animais dominantes como nos submissos, uma situação de estresse (estresse social), porém com maior intensidade nos animais submissos (FERNANDES, 1997). São peixes de hábitos lentos, resistentes à enfermidades (CASTAGNOLLI, 1992), tolerando concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a 1,0 mg/L (EL-SAYED ALI *et al.*, 2003). Segundo CASTAGNOLLI (1992), o melhor desempenho zootécnico deste peixe é obtido com a temperatura da água entre 26°C e 28°C.

### **1.2.2 Benzocaína**

A benzocaína é um anestésico local, cujo potencial de ação é semelhante ao MS-222, anestésico extensamente aplicado na piscicultura (MATTSON & RIPPLE, 1989; BURKA *et al.*, 1997; ROSS & ROSS, 1999). No entanto, este anestésico é 250 vezes menos solúvel em água, com relação ao MS-222, assim, qualquer solução contendo benzocaína têm que ser diluída em etanol, acetona ou propileno glicol (BURKA *et al.*, 1997; ROSS & ROSS, 1999).

De acordo com ROSS & ROSS (1999), são necessários 21 dias para comercialização dos peixes que foram submetidos à benzocaína e que serão utilizados para alimentação. ALLEN (1988), reportou 10,65 e 14,01 µg/g de benzocaína em largemouth bass e truta arco-íris, respectivamente, imediatamente após o tratamento. E ainda, segundo este autor, durante o estudo, os resíduos de benzocaína não foram completamente removidos dos tecidos destes animais.

Além disso, a benzocaína é um anestésico tópico eficaz, amplamente utilizado, que apresenta um início de ação quase que imediato (15 a 30 segundos) e relativamente persistente, não sendo praticamente absorvido quando usado em mucosas e na pele, nas doses recomendadas ([FARMALAB](#) CHIESI INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, 2006). Nas concentrações aplicadas nos peixes, não é tóxico para o manipulador (ALLEN, 1988) e pode ser removido da água utilizando filtro de carvão ativado (HOWE *et al.*, 1990). De acordo com ROSS & ROSS (1999), a exposição a este fármaco não implica em redução de crescimento e na atividade reprodutiva do peixe.

Como a benzocaína e o MS-222 são derivados do ácido p-aminobenzóico, causam redução da ventilação das brânquias devido à depressão dos centros medulares respiratórios, tendo a hipóxia como conseqüência. A hipóxia é intensificada pela braquicardia e decréscimo do fluxo sanguíneo entre as brânquias (TYTLER & HAWKINS, 1981).

### 1.2.3 Óleo de cravo

O óleo de cravo é derivado da haste, das folhas e dos brotos da árvore *Eugenia caryophyllata* e é utilizado em todo o mundo em aplicações que vão desde tempero até anestesia (ANDERSON *et al.*, 1997). Ele vem sendo utilizado como anestésico de peixes em vários países, com vantagens econômicas e sem propriedades tóxicas aparentes (SOTO & BURHANUDDIN, 1995; MUNDAY & WILSON, 1997; SLADKY *et al.*, 2001; WOODY *et al.*, 2002). No entanto, dados reportando concentrações ideais de óleo de cravo para induzir a anestesia de peixes tropicais são escassos (INOUE *et al.*, 2003).

Vários estudos reportam a eficácia do óleo de cravo e de seus derivados, em diversas espécies de peixes, incluindo kinguio, *Carassius lapides* (ENDO *et al.*, 1972),

rabbitfish, *Siganus lineatus* (SOTO & BURHANUDDIN, 1995), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (KEENE *et al.*, 1998), bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (WATERSTRAT, 1999) e sockeye salmão, *Oncorhynchus nerka* (WOODY *et al.*, 2002).

De maneira semelhante à benzocaína, o eugenol tem várias características que o qualificam como um anestésico seguro, de baixo custo, grande eficácia, ampla margem de segurança para o peixe e ausência de toxicidade para o operador, nas doses utilizadas para peixes (KEENE *et al.*, 1998). Outra vantagem deste fármaco é que ele é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo tempo de carência (WAGNER *et al.*, 2002). Ou seja, não causa risco à saúde do consumidor (CHO & HEATH, 2000).

A Food and Agriculture Organization (FAO) prescreve como aceitável ingestão diária de 2,5 mg eugenol/Kg peso humano. Em peixes anestesiados com 450 mg/L de óleo de cravo e depurados por uma semana antes de serem abatidos para consumo, houve retenção em seus tecidos de apenas 0,32 mg/Kg de eugenol (KILDEA *et al.*, 2004).

Além disso, o eugenol apresenta curto tempo de indução e alto tempo de recuperação anestésica, ideais para procedimentos mais demorados, comparado com o MS-222, nas mesmas concentrações (KENNE *et al.*, 1998).

SLADKY *et al.* (2001) reportaram que o eugenol foi eficaz em 100% dos pacus anestesiados (*Piaractus brachypomus*) e a anestesia foi caracterizada por rápida indução e tempo de recuperação prolongado, comparado com MS-222. No entanto, os peixes expostos a altas concentrações (100 ou 200mg/L de eugenol), devem ser monitorados, visto que pode ocorrer redução da ventilação das brânquias e colapso medular.

## **2. OBJETIVO GERAL**

- Analisar a ação de dois anestésicos (óleo de cravo e benzocaína) em *Oreochromis niloticus*.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Testar, entre várias concentrações de óleo de cravo e benzocaína, quais apresentaram melhores tempos e indução e recuperação anestésica.
- Avaliar a sensibilidade nos peixes anestesiados às concentrações escolhidas, com o auxílio do monitoramento cardíaco.
- Analisar a ação dos dois anestésicos, nas concentrações recomendadas anteriormente, a 23°C e a 28°C, sobre o tempo de indução e recuperação anestésica, os parâmetros fisiológicos (análises hematológicas, de cortisol e de glicose)
- Avaliar o tempo de retorno à alimentação após o tratamento anestésico.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Tempo de indução e de recuperação anestésica**

Na primeira série de testes determinou-se, entre cinco concentrações de óleo de cravo e três de benzocaína, os efeitos sobre o tempo de indução e recuperação anestésica, para depois, utilizar as concentrações escolhidas em teste definitivo.

##### **3.1.1 Material biológico e aclimação**

Juvenis de tilápia, *Oreochromis niloticus*, foram obtidos de uma piscicultura comercial do Estado de São Paulo. Os peixes ( $n = 40$ ,  $108,28 \pm 11,65\text{g}$ ) foram aclimatados em um tanque de 500 L, com sistema de aeração constante, por 30 dias. Os testes foram conduzidos em aquários com capacidade para 9 L, contendo 5 L de água.

##### **3.1.2 Local de realização do experimento**

A aclimação foi realizada na área externa do Instituto de Pesca, no Parque da Água Branca, em São Paulo/SP. Já, o experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do próprio Instituto.

##### **3.1.3 Delineamento experimental e procedimentos**

Os peixes ( $n = 5$ , para cada concentração) foram individualmente expostos a concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 mg/L de óleo de cravo, e 50, 100 e 150 mg/L de benzocaína. As diluições dos anestésicos, assim como as concentrações utilizadas para cada teste, encontram-se na tabela 1.

A água do aquário foi trocada ao término de cada teste.

**Tabela 1:** Ingredientes utilizados para as concentrações anestésicas e pesos médios de tilápias (*O. niloticus*) testadas

Ingredientes e pesos	Óleo de cravo (mg/L)					Benzocaína (mg/L)		
	40	60	80	100	120	50	100	150
óleo de cravo (ml)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6			
etanol (ml)	1,8	2,7	3,6	4,5	5,4			
água (L)	5	5	5	5	5	5	5	5
benzocaína (g)						0,25	0,5	0,75
etanol (ml)						3,33	6,66	10,0
peso (g)	115,6	115,35	113,73	103,98	105,89	106,63	102,78	102,26
SEM	(21,05)	(6,45)	(8,93)	(9,83)	(9,3)	(6,5)	(11,89)	(10,37)

SEM = erro padrão

As concentrações de óleo de cravo e benzocaína determinadas para este estudo, foram escolhidas uma vez que estas dosagens são as mais aplicadas em estudos com anestesia profunda.

Os anestésicos utilizados no experimento são hidrofóbicos, ou seja, não diluem na água. Assim, foi necessário, primeiramente, que estas substâncias fossem diluídas em etanol. Para confirmar a ação do anestésico, e não do diluente, testou-se 10 ml de etanol em 5 L de água, ou seja, a maior concentração utilizada para diluição do fármaco.

Durante a exposição, foram observados os diferentes estágios de indução à anestesia (Quadro 1). Após este período, os peixes foram removidos da solução anestésica e colocados em um aquário com capacidade de 9 L, contendo 5 L de água e aeração constante, para monitorar a recuperação.

**Quadro 1:** Estágios anestésicos da anestesia, segundo ROUBACH & GOMES (2001)

estágio de anestesia	descrição do comportamento
(1) sedação leve	perda de reação aos movimentos visuais e ao toque
(2) anestesia leve	perda parcial do equilíbrio
(3) anestesia profunda	perda total do equilíbrio
(4) anestesia cirúrgica I	diminuição dos movimentos operculares
(5) anestesia cirúrgica II	Mínimo movimento opercular, o peixe fica estático
(6) colapso medular	overdose ou tempo excessivo de anestesia

### **3.2 Monitoramento cardíaco**

A segunda série de testes constou de análises da frequência cardíaca dos peixes anestesiados, utilizando-se concentrações dos anestésicos selecionadas no teste anterior, que foram 60 e 80 mg/L de óleo de cravo e 100 e 150 mg/l de benzocaína.

#### **3.2.1 Material biológico**

Foram utilizados 20 juvenis de tilápia obtidos do mesmo lote do experimento anterior. O experimento foi realizado cinco meses após o teste Tempo de indução e de recuperação anestésica.

#### **3.2.2 Delineamento experimental e procedimentos**

Os ensaios foram conduzidos em aquários com capacidade para 9 L, contendo apenas 5 L de água.

Escolheu-se, aleatoriamente, vinte juvenis de tilápia, sendo dez anestesiados com benzocaína (cinco peixes por concentração – 100 e 150 mg/L) e dez com óleo de cravo (cinco animais por concentração – 60 e 80 mg/L).

Esse procedimento foi realizado por monitoramento cardíaco através de cardioscopia. Inicialmente os peixes foram anestesiados para posicionamento dos eletrodos (Figuras 1 e 2). A recuperação anestésica ocorreu em aquário isento de anestésico. Após a recuperação do equilíbrio, esperou-se 30 minutos para as mensurações dos valores basais de frequência cardíaca e movimentos operculares.

Após a leitura da frequência cardíaca basal média, esses animais foram novamente anestesiados para a determinação da frequência cardíaca dos peixes anestesiados. Quando estes se apresentavam no 5º estágio anestésico, aplicou-se um



estímulo com agulha com o intuito de determinar a reação do peixe e possível alteração da frequência cardíaca.

Os testes do primeiro e do segundo ensaios foram realizados a 23°C. Essa temperatura é a normalmente utilizada em aquários para manutenção de peixes.



**Figura 1:** Juvenil de *O. niloticus* com eletrodos fixados em seu corpo para posterior mensuração da frequência cardíaca



**Figura 2:** Leitura da frequência cardíaca pela cardioscopia

### **3.3 Análises fisiológicas e tempo de retorno à alimentação**

Na terceira série de testes, as concentrações mais adequadas para juvenis de tilápia ( $n = 48$ ,  $194,51 \pm 6,75\text{g}$  e  $22,21 \pm 0,27\text{cm}$ ), de óleo de cravo e benzocaína, foram testadas em duas temperaturas, à  $23^{\circ}\text{C}$  e à  $28^{\circ}\text{C}$ , mantidas com termostato.

#### **3.3.1 Material biológico**

Os animais foram cedidos pela Associação Brasileira do Peixe, de Itupeva/SP. Foram coletados de um tanque-rede com o auxílio de puçás e transportados para o Instituto de Pesca em um tanque de 300 L com 3% de NaCl dissolvido na água.

#### **3.3.2 Local de realização do experimento**

As tilápias foram aclimatadas, por 15 dias, no Aquário do Instituto de Pesca, em um aquário de 5000 L, com água decolorada e aeração constantes. Mediu-se diariamente, o oxigênio dissolvido com o auxílio de um oxímetro, o pH e a temperatura da água. Depois, foram transferidos para dois tanques no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do próprio Instituto, local onde foi realizado o ensaio.

#### **3.3.3 Delineamento experimental e procedimentos**

Os tanques ( $n = 24$  peixes por tanque) de 300 L cada, com água decolorada e aeração constante, armazenavam água em temperaturas diferentes, um à  $23^{\circ}\text{C}$  e o outro à  $28^{\circ}\text{C}$ , mantidas com o auxílio de termostatos de 200W cada. Os peixes permaneceram nestes tanques por três dias e ficaram em jejum, por 24 horas, antes do experimento para posterior testes de alimentação.

Mediu-se, diariamente, o oxigênio dissolvido, a temperatura e o pH de ambos os tanques.

Após o período de aclimação, esses organismos-teste foram expostos, individualmente, em aquários com 5 L de água dechlorada e nas temperaturas de acordo com a aclimação, a concentrações de 80 mg/L de óleo de cravo (n = 8, para cada temperatura), 100 mg/L de benzocaína (n = 8, para cada temperatura) e não expostos a anestésicos, ou seja, os animais do grupo controle (n = 8, para cada temperatura). Os aquários também foram abastecidos com água dechlorada nas temperaturas desejadas para o teste, mantidas com o auxílio de um termostato de 50W.

Cada peixe foi anestesiado individualmente e, logo em seguida, retirado do aquário, pesado e o sangue coletado do vaso caudal, com auxílio de seringas e agulhas heparinizadas. Os animais do grupo controle não foram anestesiados por nenhum fármaco, entretanto, eles passaram pelo mesmo procedimento dos animais expostos aos anestésicos. A colheita de sangue desses peixes foi realizada entre 9:00 e 11:00 horas, período em que o cortisol apresenta menor variação.

Após este procedimento, cada peixe foi colocado, individualmente, em aquário sem anestésico, contendo 5 L de água dechlorada com aeração constante, para monitoramento da recuperação do fármaco.

Para avaliar os estágios de evolução da anestesia foi utilizado o critério proposto por ROUBACH & GOMES (2001) (Tabela 2). O peixe foi considerado recuperado quando retornava os movimentos e nadava ativamente (GOMES *et al.*, 2001).

### 3.3.3.1 Tempo de retorno à alimentação

Vinte e quatro horas após a recuperação total dos peixes, foi oferecido a cada animal 3% de sua biomassa, de ração comercial e deixada à disposição por 10 minutos. Caso os peixes, após o tempo esperado, não comessem toda a ração, esta era retirada do aquário, seca e pesada. Assim, fez-se a diferença entre a quantidade de ração colocada inicialmente menos a quantidade de ração retirada depois de 10 minutos. Este teste foi realizado com todos os peixes que participaram do experimento (48 animais). Assim, estes dados informaram quantos gramas de ração o peixe comeu 24 horas após ser tratado com dois anestésicos, um natural e um sintético, em duas temperaturas.

### 3.3.3.2 Análises hematológicas

O sangue coletado dos animais foi utilizado para as determinações de:

- a) número total de células, contado em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Hayem como diluente;
- b) hematócrito, pelo método do microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971);
- c) taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944);

Com os resultados da taxa de hemoglobina (Hb), do número total de células (Er) e do hematócrito (Ht) foram calculados os índices hematimétricos absolutos:

$$\text{Volume corpuscular médio: VCM} = \frac{\text{Ht} \times 10}{\text{Er}} = \text{fL}$$

$$\text{Hemoglobina Corpuscular Média: HCM} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{Er}} = \mu\text{g}$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média:  $CHCM = \frac{Hb \times 100}{Ht} = g/dL$

d) extensões sangüíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo ROSENFELD (1947), foram utilizadas para as contagens diferencial e total dos leucócitos e contagem total de trombócitos, sendo as duas últimas pelo método indireto, segundo HRUBE & SMITH (1998).

Uma alíquota do sangue foi centrifugada para obtenção do plasma, utilizado nas determinações de:

a) glicose, através do bioplus, com a utilização de kits da Labtest.

b) cortisol, pelo método de imunensaio do tipo "enzyme linked immunosorbent assay"- ELISA (GODFREY, 1998). Os imunoenaios baseiam-se na reação antígeno-anticorpo e posterior revelação desta reação, de forma a quantificar e qualificar o ensaio (KÖHLER & MILSTEIN, 1975).

### **3.4 Análises estatísticas**

Os dados obtidos nas análises deste experimento foram submetidos ao teste estatístico "ANOVA" e teste Tukey, comparando a diferença entre as médias dos tratamentos, por tempo e entre as concentrações (ZAR, 1996).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Tempo de indução e de recuperação anestésica

As tilápias, expostas ao óleo de cravo e à benzocaína, passaram seqüencialmente por todos estágios de anestesia descritos por ROUBACH & GOMES (2001) (Quadro 1). No entanto, com ambos os anestésicos, não foi possível mensurar o estágio 1 da anestesia, uma vez que a perda de reação aos estímulos visuais e ao toque ocorreu logo que os animais entravam em contato com o anestésico, em todas as concentrações testadas.

Na tabela 2 encontram-se as médias dos tempos de indução dos estágios anestésicos (2, 3, 4 e 5) de acordo com ROUBACH & GOMES (2001) e as médias dos tempos de recuperação, de ambos anestésicos, em todas as concentrações testadas.

**Tabela 2:** Tempos de indução e de recuperação dos dois anestésicos testados em *O. niloticus*, nas concentrações utilizadas

		Tempo dos estágios anestésicos (min)				Recuperação (min)
Concentração anestésica		2	3	4	5	
Óleo de cravo (mg/L)	40	3,0 ± 1,22 <sup>b</sup>	4,8 ± 1,48 <sup>b</sup>	6,7 ± 2,17 <sup>b</sup>	8,0 ± 0,84 <sup>b**</sup>	12,2 ± 0,97 <sup>a</sup>
	60	0,8 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,42 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,37 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,40 <sup>a</sup>
	80	1,2 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,55 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,50 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,20 <sup>a</sup>	10,2 ± 1,02 <sup>a</sup>
	100	0,5 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,42 <sup>a</sup>	2 ± 0,32 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,55 <sup>a</sup>
	120	0,8 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,67 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,58 <sup>a</sup>	25,4 ± 4,83 <sup>b*</sup>
Benzocaína (mg/L)	50	3,2 ± 0,45 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,84 <sup>b</sup>	9,4 ± 0,89 <sup>b</sup>	12,2 ± 0,66 <sup>b**</sup>	7,1 ± 0,55 <sup>a</sup>
	100	1,2 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,84 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,97 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,68 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,93 <sup>a</sup>
	150	0,8 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,61 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,61 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,37 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,73 <sup>a</sup>

\* p < 0,01

\*\* p < 0,001

Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,5).

Para a preparação da solução anestésica, substâncias estressoras como aeradores e outros peixes, foram removidos do aquário. Em relação à alimentação, os animais que passaram pelo processo de anestesia ficaram em jejum por 24 horas antes do procedimento, uma vez que a alimentação interfere na ação do fármaco (BROWN, 1993).

Nenhuma morte foi observada durante e depois do teste de indução anestésica.

Primeiramente, os animais foram submetidos ao tratamento com etanol, com o intuito de se observar possíveis modificações de comportamento causado pelo diluente. Os peixes colocados em solução de etanol não apresentaram indução anestésica, ou qualquer modificação aparente no comportamento, corroborando os resultados apresentados por MYLONAS *et al.* (2005).

As tilápias imersas nas soluções com benzocaína, no estágio anestésico 2, debateram-se violentamente antes de perder o equilíbrio (estágio 3). Os animais expostos à 50mg/L do fármaco requereram significativamente mais tempo para atingir todos os estágios de indução anestésica, comparado com os peixes tratados com as demais concentrações (100 e 150mg/L). Porém, ainda em relação ao tempo de indução, não houve diferença significativa entre as respostas obtidas com as soluções de 100 e 150mg/L de benzocaína.

Em relação ao tempo de recuperação, não houve diferença estatística entre todas as respostas obtidas com as concentrações testadas, apesar de as tilápias anestesiadas com 50mg/L de benzocaína necessitarem de mais tempo ( $7,1 \pm 0,55$  min) para se recuperarem do que os animais tratados com 100 e 150mg/L ( $6,4 \pm 0,93$  e  $5,8 \pm 0,73$  min, respectivamente) (Tabela 2).

De acordo com OSTRENSKY *et al.* (2000) e GOMES *et al.* (2001), o tempo de recuperação do peixe é influenciado pelo tempo de exposição ao fármaco e pela temperatura. Quanto menor a exposição ao anestésico e menor a temperatura da água, mais rápida é a recuperação. Neste experimento, como a temperatura foi a mesma para todas as concentrações testadas, nota-se que, com o aumento da concentração anestésica, diminuiu-se o tempo de indução e, conseqüentemente, o tempo de recuperação também foi menor em relação às menores concentrações.

Assim, determinou-se que 100 – 150 mg/L como as melhores concentrações de benzocaína, entre as três concentrações testadas, para tilápia com  $108,28 \pm 11,65g$ , à 23°C.

BARHAM *et al.* (1979), acompanhando a ação da benzocaína para tainha, *Liza macrolepis*, verificou ser este um bom anestésico, em concentrações variando de 25 a 100mg/L. Já, em relação a tilápia, *Sarotherodon mossambicus*, a benzocaína não foi efetiva, segundo o mesmo autor. Calculando o tempo de indução ao anestésico, os autores notaram que, para tainha, o tempo de indução diminuiu progressivamente com o aumento de sua concentração. O mesmo ocorreu com as tilápias do presente ensaio.

FRANCISCHINI & CARAMASCHI (1989), testando benzocaína em diferentes peixes de água doce do rio Ubatiba (Maricá – RJ), observaram que a concentração que apresentou melhor resultado foi de 250 mg/L.

Segundo FAÇANHA & GOMES (2005), a melhor concentração de benzocaína para anestesia cirúrgica foi 150 mg/L, uma vez que o tempo de indução foi menor, porém a recuperação foi significativamente mais demorada do que para as menores concentrações testadas. Para anestesia com finalidade de biometria, a melhor



concentração foi de 100mg/L. Nesta concentração, o tempo de indução à anestesia foi prolongado, porém o tempo de recuperação está dentro da faixa considerada adequada, para procedimentos desta natureza.

MATTSON & RIPPLE (1989), testando vários anestésicos para o bacalhau, *Gadus morhua*, observaram que a concentração de 40mg/L de benzocaína produziu rápida anestesia (3 min). O tempo de recuperação foi entre 3,9 - 10,8 min.

OSTRENSKY *et al.* (2000) concluíram que a concentração ótima para se obter um estado completo de anestesia em tilápias *O. niloticus* foi de 60 mg/L de benzocaína.

GOMES *et al.* (2001), testando diferentes concentrações de benzocaína em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, concluíram que a dose ideal é de 100 – 150 mg/L.

CROUX & MONTAGNA (1998) determinaram que 100 mg/L de benzocaína é uma concentração efetiva e segura para juvenis de bagre, *Pimelodus clarias maculatus*, semelhante ao resultado do presente estudo.

Para salmão do Atlântico, *Salmo salar*, a benzocaína foi eficaz em uma pequena concentração, apenas 30 mg/L (IVERSEN *et al.*, 2003). A concentração de 35 mg/L de benzocaína foi considerada adequada para induzir o peixe (nos estágios 3 e 4) em 3 minutos em truta arco-íris (GILDERHUS & MARKING, 1987), mas para outras espécies, concentrações de 80 – 200 mg/L foram requeridas para induzir a anestesia (DAWSON & GILDERHUS, 1979).

O eugenol (ingrediente ativo encontrado no óleo de cravo) mostrou-se bastante eficaz na imobilização de inúmeras espécies de peixes para a piscicultura e para pesquisa

(KEENE *et al.*, 1998; TYE & PAGE, 1998; STEHLY & GINGERICH, 1999; CHO & HEATH, 2000).

Em relação aos estágios anestésicos descritos (Tabela 2), verificou-se haver diferença estatística entre os tempos de indução somente na menor concentração de óleo de cravo testada (40 mg/L). Em relação ao tempo de recuperação, não houve diferença estatística entre as quatro primeiras concentrações testadas (40, 60, 80 e 100 mg/L), apesar de que o menor tempo de recuperação foi de  $7,4 \pm 0,4$  min, à 60 mg/L. A diferença mostrou-se estatisticamente significativa quando os peixes foram anestesiados com 120 mg/L, com média do tempo de recuperação de  $25,4 \pm 4,83$  min.

Determinou-se que, entre 60 – 100 mg/L, encontrou-se as melhores concentrações de óleo de cravo, para tilápias na faixa de peso utilizada, à 23°C, corroborando os dados obtidos por PEAKE (1998), que recomendou dosagem similar (60 mg/L) para não salmonídeos.

O óleo de cravo é proposto por INOUE *et al.* (2003), como anestésico alternativo por ser produto natural de custo acessível e sem riscos aparentes de intoxicação para os animais anestesiados. Segundo os autores, a concentração de 40mg/L foi suficiente para anestésiar juvenis de matrinxã, *Brycon cephalus*, em aproximadamente 1 min, sendo a recuperação independente da concentração do anestésico.

Segundo COOKE *et al.* (2004), concentrações entre 5 a 9 mg/L de óleo de cravo, para *Micropterus salmoides*, mostraram-se eficazes para transporte e manipulação dos peixes. A sedação resultou em perda de reação e redução dos batimentos cardíacos, enquanto que o peixe mantinha o equilíbrio. Peixes anestesiados com concentrações entre

5 mg/L a 9 mg/L apresentaram indução anestésica e recuperação do comportamento mais rápida, quando comparada com as maiores concentrações (acima de 9 mg/L).

De acordo com KEENE *et al.* (1998), a dose recomendada do óleo de cravo é entre 40 a 60 mg/L para juvenis de *Oncorhynchus mykiss*, em exposições de 3 a 6 minutos. Para o transporte (de 6 a 8 horas), os autores recomendam uma dose aproximada de 2 mg/L.

Pesquisando a eficácia do óleo de cravo (100% eugenol), KEENE *et al.* (1998) e SLADKY *et al.* (2001) determinaram que o tempo de indução foi mais rápido e a recuperação mais prolongada em peixes expostos ao eugenol, comparado com aqueles expostos ao MS-222.

Juvenis de chinook salmão, *Oncorhynchus tshawytscha* (7,0°C, peso 40,0g), atingiram o 5º estágio anestésico após 2 minutos, à 20mg/L de óleo de cravo (CHO & HEATH, 2000). Resultados similares obtidos por ENDO *et al.* (1972) mostraram que 25mg/L de óleo de cravo foi eficaz para anestésiar truta arco-íris (14,0°C, peso 12,0g) em 2,5 minutos, enquanto KEENE *et al.* (1998) mostraram que peixes da mesma espécie (9,1°C, peso 20,5g) perde o equilíbrio (3º estágio) em 1,8 – 0,6 min, para dosagens de 20 – 100 mg/L. Entretanto, no presente experimento não foram observadas rápidas induções anestésicas com baixas concentrações anestésicas.

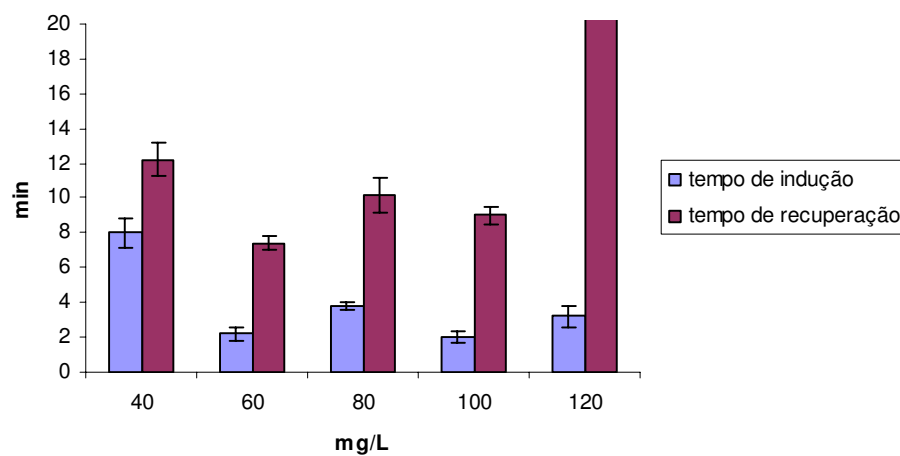
Analisando o comportamento das tilápias submetidas à anestesia com óleo de cravo, notou-se que os animais não se debateram durante o processo de indução e de recuperação. PEAKE (1998), anestesiando não salmonídeos, também observou o comportamento com os animais expostos às diversas concentrações de óleo de cravo.

Os dados do presente trabalho corroboram os resultados de KEENE *et al.* (1998), que mostraram que truta arco-íris, *O. mykiss*, precisa de aproximadamente 5,8 – 2,2 min para atingir o 5º estágio anestésico em concentrações de 30 a 100 mg/L de eugenol, e também os resultados de WATERSTRAT (1999), que recomendou 100 mg/L de óleo de cravo para bagre de canal, *Ictalurus punctatus*.

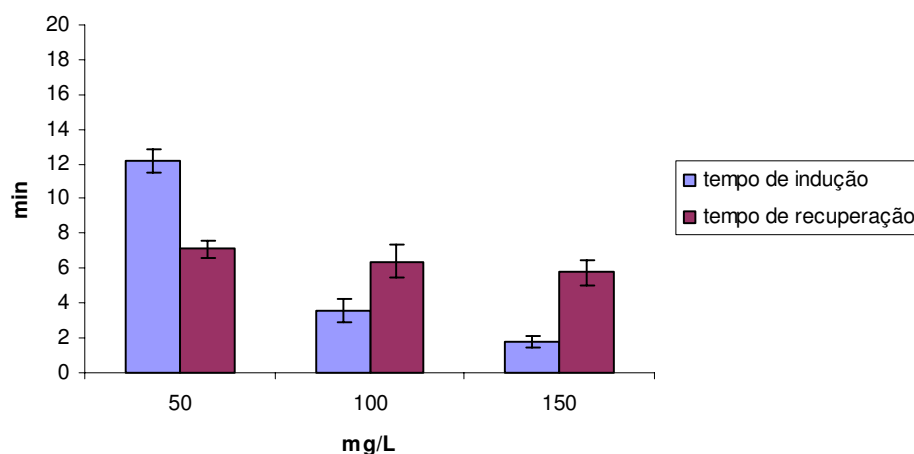
As diferenças entre as concentrações anestésicas observadas neste estudo, em relação aos dados de outros pesquisadores, podem ser explicadas devido às diferenças de temperatura, espécie e tamanho do organismo-teste (OLSEN *et al.*, 1995; STEHLY & GINGERICH, 1999).

Assim, a eficácia do anestésico é dependente de inúmeros fatores. Por exemplo, o aumento de temperatura potencializa a ação de vários anestésicos (OLSEN *et al.*, 1995; STEHLY & GINGERICH, 1999). O peso também parece ser positivamente relacionado com a eficácia do fármaco (OLSEN *et al.*, 1995). Diferenças da ação do anestésico entre espécies estão claramente ilustradas no estudo de STEHLY & GINGERICH (1999), onde uma dosagem de 10,8 mg/L de iso-eugenol (20mg/L Aqui-S™) apresentou tempo de indução de 5,3 minutos para *Ictalurus punctatus* e 1,2 min para *Lepomis macrochirus*.

Na figuras 3 e 4 encontram-se as médias dos tempos de indução e de recuperação, de ambas os anestésicos, em todas as concentrações.



**Figura 3:** Tempos de indução e de recuperação, em minutos, de óleo de cravo, nas concentrações testadas em *O. niloticus*



**Figura 4:** Tempos de indução e de recuperação, em minutos, de benzocaína, nas concentrações testadas em *O. niloticus*

É possível visualizar nas figuras 3 e 4 que, nas concentrações similares dos fármacos, com o óleo de cravo, obtém-se tempos de indução anestésica menores. Por exemplo, a 40 ou 60 mg/L do anestésico natural o tempo de indução foi  $8,0 \pm 0,84$  e  $2,2 \pm 0,37$  min, respectivamente; na concentração de 50 mg/L do anestésico sintético, o tempo foi de  $12,2 \pm 0,66$  min. Já, em relação ao tempo de recuperação, o perfil

apresentou-se contrário à indução, ou seja, a 40 ou 60 mg/L de óleo de cravo, o tempo de recuperação foi  $12,2 \pm 0,97$  e  $7,4 \pm 0,40$  min, respectivamente; e a 50 mg/L de benzocaína, o tempo foi de  $7,0 \pm 1,55$ . Ou seja, comparando-se concentrações similares dos anestésicos testados, nota-se que o óleo de cravo, em relação a benzocaína, apresenta menor tempo de indução e maior tempo de recuperação.

Esses resultados corroboram os dados obtidos por SLADKY *et al.* (2001), que compararam os tempos de indução e de recuperação do óleo de cravo e do MS-222. Já ANDERSON *et al.* (1997) observaram que o tempo de indução do óleo de cravo foi mais rápido comparado com o MS-222, entretanto o tempo de recuperação foi similar em ambos anestésicos testados.

O menor tempo de recuperação observado com a benzocaína pode ser devido à rápida eliminação deste anestésico durante a recuperação, reativando os centros respiratórios antes que a depleção de oxigênio se torne crítica (MATTSON & RIPPLE, 1989).

Assim como o MS-222 (triclaína metanosulfato), o eugenol é um anestésico eficaz. No entanto, o eugenol é caracterizado por apresentar indução anestésica mais rápida, recuperação prolongada e margem de segurança limitada. O alto tempo de recuperação apresentado por peixes anestesiados com eugenol pode ser ideal para ser usado em biometrias, cirurgias ou manejo de desova, visto que nestas manipulações, é necessário que o peixe permaneça anestesiado por um longo período de tempo depois de ser removido da solução anestésica (PRINCE & POWELL, 2000).

Além disso, de acordo com SLADKY *et al.* (2001), é necessário se ter cuidado quando são aplicadas concentrações de eugenol acima de 100 mg/L para indução, porque pode ocorrer rapidamente queda ventilatória.

## **4.2 Monitoramento cardíaco**

Para o teste de frequência cardíaca escolheu-se as concentrações que apresentaram os menores tempos de indução e de recuperação. Portanto, para o óleo de cravo, escolheu-se 60 e 80 mg/L, uma vez que as concentrações de 60 a 100 mg/L apresentaram perfis similares em relação aos tempos anestésicos. Assim, deu-se preferência às menores concentrações.

Para a benzocaína, foram utilizadas as concentrações de 100 e 150 mg/L, visto que, a 50 mg/L, o tempo de indução anestésica foi muito alto.

Segundo COVINO (1987), após a absorção sistêmica, o anestésico local age no sistema cardiovascular.

No presente experimento, foram avaliadas frequência cardíaca, movimentos operculares, equilíbrio e resposta à estímulos dos peixes submetidos aos anestésicos.

### **4.2.1 Frequência cardíaca dos peixes anestesiados com óleo de cravo**

Os dados da frequência cardíaca e do número de movimentos operculares/ minuto das tilápias anestesiadas com óleo de cravo a 60 e 80mg/L encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3:** Frequência cardíaca e número de movimentos operculares/minuto de tilápia, *O. niloticus* anestesiada com óleo de cravo (n = 5 peixes por concentração)

Óleo de cravo (mg/L)	Frequência cardíaca			
	basal	estágio 5	estágio 5 (com agulha)	Recuperação
60	120bat/min	80bat/min	100bat/min	120bat/min
80	120bat/min	80bat/min	80bat/min	120bat/min
	<b>Movimentos operculares</b>			
60	80/min	36/min	40/min	40/min
80	80/min	sem mov. oper.	sem mov. oper.	48/min

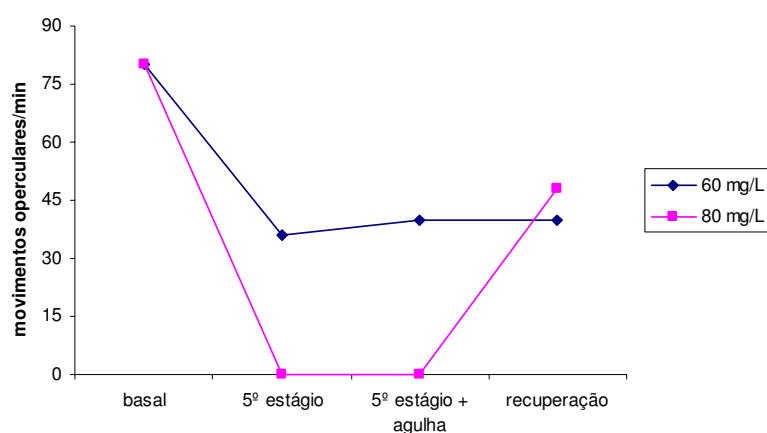
Nos grupos de peixes anestesiados com 60 e 80 mg/L de óleo de cravo, a frequência cardíaca basal de todos os animais testados foi de 120 batimentos/min e de 80 movimentos operculares/min. Com 60 mg/L, no último estágio anestésico, houve diminuição de 55% dos movimentos operculares e de 33% da frequência cardíaca. Neste momento, aplicou-se uma agulha esperando que sua frequência cardíaca não se alterasse, pois assim se confirmaria o estágio anestésico profundo do peixe. No entanto, isso não aconteceu, visto que os batimentos do coração aumentaram de 80/min (antes da agulha) para 100/min (após a agulha). Já com 80 mg/L, no 5º estágio anestésico, os batimentos cardíacos também diminuíram 33% e os movimentos operculares cessaram. Além disso, não houve alteração da frequência cardíaca com a aplicação da agulha, comprovando a anestesia profunda do animal. É interessante notar que a anestesia profunda a 80 mg/L foi acompanhado por parada dos movimentos operculares, o que não ocorreu na concentração inferior e, somente neste estágio, ocorreu ausência de estímulos.

A recuperação anestésica teve início após  $10,4 \pm 0,98$  min da ausência de resposta à sensibilidade, através da imersão do peixe em aquário sem anestésico, sendo comprovada com o retorno da frequência cardíaca a nível basal (120 batimentos/min). Entretanto, os movimentos operculares apresentaram-se inferiores em relação ao valor inicial.

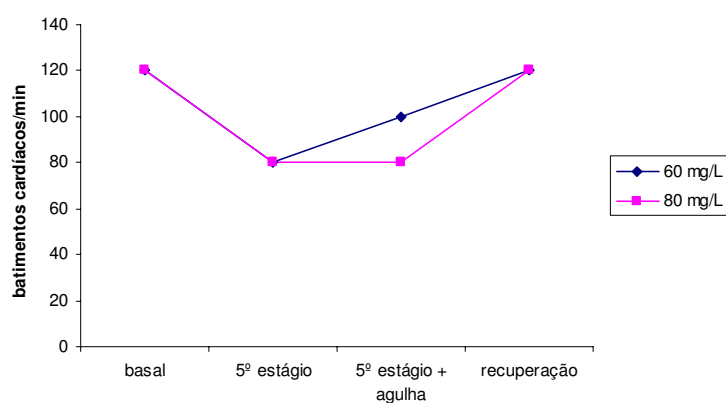


Frente a estes resultados pode-se concluir que a dose de 80 mg/L, apesar do cessamento dos movimentos operculares, não promove colapso medular e sim anestesia cirúrgica. Já a dose de 60 mg/L promove sedação profunda com perda total do equilíbrio.

Nas figuras 5 e 6 encontram-se os perfis do monitoramento cardíaco e dos movimentos operculares durante todo o experimento, nas duas concentrações aplicadas.



**Figura 5:** Perfil dos movimentos operculares nas duas concentrações de óleo de cravo em tilápia, *O. niloticus*



**Figura 6:** Perfil da frequência cardíaca nas duas concentrações de óleo de cravo em tilápia, *O. niloticus*

ROTHWELL *et al.* (2005), analisando alterações cardiovasculares em *Oncorhynchus tshawytscha* anestesiados com 60 mg/L de AQUI-S (derivado do óleo de cravo), observaram que a frequência cardíaca destes animais antes da indução anestésica era de  $43,7 \pm 3,3$  batimentos/min e, durante a indução, houve aumento constante desta frequência, tornando-se diferente significativamente dos valores basais após 3 minutos de anestesia. Segundo os mesmos autores, houve queda gradativa dos batimentos do coração durante a recuperação. Já, HILL *et al.* (2004), utilizando também 60 mg/L de AQUI-S, notaram queda da frequência cardíaca dos peixes nos primeiros 2 minutos de exposição ao fármaco.

De acordo com HILL *et al.* (2004), como a anestesia é precedida de contato físico, esta manipulação causa significativo aumento das variáveis cardiovasculares, mascarando assim qualquer efeito dependente da anestesia. Portanto, estes dados sugerem que a limitação da manipulação é mais importante para minimizar os distúrbios cardiovasculares que a escolha dos anestésicos.

#### **4.1.2 Frequência cardíaca dos peixes anestesiados com benzocaína**

Nos grupos de peixes anestesiados com 100 e a 150 mg/L de benzocaína, observou-se que a frequência basal de todas as tilápias testadas foi de 120 batimentos/min e de 80 movimentos operculares/min. No entanto, não foi possível mensurar a frequência cardíaca dos animais anestesiados, por isso, não foi possível aplicar o teste com a agulha. Com a recuperação, os batimentos cardíacos foram de 100 batimentos/min, e com 48 e 20 movimentos operculares/min, a 100 e 150 mg/L, respectivamente. Já, com os peixes totalmente recuperados, a frequência cardíaca foi de 120 batimentos/min e 48 movimentos operculares/min, em ambas as concentrações.

É importante salientar que, apesar de não se conseguir mensurar a frequência cardíaca, notou-se que, tanto em 100 como em 150 mg/L, quando os organismos-teste encontravam-se no último estágio anestésico, os movimentos operculares pararam.

A não mensuração dos batimentos cardíacos dos peixes pela cardioscopia pode ser porque estes apresentaram altas taxas de frequência cardíaca, que o próprio aparelho não conseguiu mensurar. Estas altas taxas da frequência cardíaca podem ser explicadas pela hidrofobicidade deste fármaco, já que a benzocaína é um anestésico que contém metades hidrofílica e hidrofóbica separadas por um éster intermediário. O grupo hidrofílico é uma amina, a metade hidrofóbica é aromática e a ligação do grupo éster é hidrolisada rapidamente pelas esterases plasmáticas (CATTERALL & MACKIE, 1996).

De acordo com CATTERALL & MACKIE (1996), a hidrofobicidade aumenta a potência e a duração da ação do anestésico. Isso ocorre pois a associação do fármaco nos locais hidrofóbicos intensifica sua distribuição para os locais de ação e reduz a taxa de metabolismo pelas esterases plasmáticas e enzimas hepáticas. Além disso, acredita-se que o local do receptor para esses fármacos nos canais de  $\text{Na}^+$  seja hidrofóbico, de modo que a afinidade do receptor pelos anestésicos seja maior para fármacos mais hidrofóbicos. A hidrofobicidade também aumenta a toxicidade, de forma que o índice terapêutico, na verdade, seja menor para fármacos mais hidrofóbicos.

RANDALL (1962), analisando os efeitos de MS-222 no coração e na respiração de peixes teleósteos, observou que com este anestésico houve aumento da frequência cardíaca, sendo diretamente proporcional à concentração do anestésico. HILL *et al.* (2004), anestesiando trutas arco-íris, *O. mykiss*, com o mínimo distúrbio, observaram que não houve alteração significativa na frequência cardíaca. No referido

experimento, com a utilização da benzocaína, observou-se redução da frequência cardíaca, sendo esta independente da concentração anestésica.

SANDBLOM & AXELSSON (2005), obtiveram frequência cardíaca para truta arco-íris de  $66,2 \pm 5,5$  batimentos/minuto, corroborando os resultados de CONKLIN *et al.* (1997), que estudando a frequência cardíaca de truta arco-íris, *O. mykiss*, reportou valores de  $68,7 \pm 1,8$  batimentos/minuto durante condições de normóxia a 12°C. No experimento do presente trabalho, registrou-se frequência cardíaca de tilápias, a 23°C, mais alta que em relação às obtidas pelos autores citados anteriormente. Essa diferença de valores pode ser explicada pela alteração de metodologia, uma vez que no presente trabalho a frequência cardíaca foi obtida a partir da cardioscopia e os pesquisadores citados puncionaram o pericárdio através de intervenção cirúrgica.

Assim, como os resultados do teste preliminar e o de monitoramento cardíaco apresentaram dados semelhantes, definiu-se como concentração ideal para procedimentos invasivos como cirurgias, para tilápia, a 23°C, 100 mg/L de benzocaína.

#### **4.2 Análises fisiológicas e tempo de retorno à alimentação**

Na água utilizada no transporte (da piscicultura comercial para o tanque de aclimação do Instituto de Pesca) dos peixes para o experimento, foram dissolvidos 3% de NaCl (sal de cozinha), em 300 L de água. O uso do sal de cozinha como redutor de estresse é amplamente difundido na aquicultura para igualar o gradiente osmótico entre a água e o plasma do peixe, fazendo com que haja uma redução na difusão de íons para a água. O sal também estimula a secreção de muco sobre o epitélio branquial, dificultando a passagem de íons através das membranas celulares (WURTS, 1995). Além de reduzir o

estresse, o sal também tem efeito profilático, é de fácil obtenção e baixo custo, com eficácia comprovada em várias espécies (BARTON & ZITZOW, 1995; ALLYN *et al.*, 2001).

Analisando o peso e o comprimento total dos peixes utilizados no experimento, nota-se que não houve diferença significativa, em todos os tratamentos.

#### **4.2.1 Características da água**

Durante o período de aclimação, a temperatura da água do tanque variou entre 23,9 a 27,6 °C, o pH entre 5,8 a 6,88 e o oxigênio dissolvido entre 3,17 a 4,7 mg/L.

Mediu-se também, após a transferência dos animais para os aquários de experimentação, a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido dos dois aquários. A variação do primeiro foi 28 a 28,6 °C, 7,45 a 7,58 e 2,95 a 3,52 mg/L; o segundo variou de 23 a 23,2 °C, 7,34 a 7,57 e 3,93 a 4,26 mg/L. As variáveis físicas (pH e temperatura) e químicas (oxigênio dissolvido) utilizadas no trabalho, não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos durante o período de experimentação.

#### **4.2.2 Ação dos anestésicos**

Os peixes imersos nas soluções com anestésicos (80mg/L de óleo de cravo e 100mg/L de benzocaína) passaram por todos os estágios anestésicos descritos na tabela 2.

Na tabela 4 encontram-se as médias dos tempos de indução e de recuperação de peixes anestesiados em ambas as concentrações, nas duas temperaturas testadas, ou seja, à 23°C e à 28°C.

**Tabela 4:** Médias dos tempos de indução e de recuperação de *O. niloticus* anestesiada com óleo de cravo e benzocaína, em duas temperaturas

Anestésico	Temperatura	Tempo de indução (min)	Tempo de recuperação (min)
Óleo de cravo (80mg/L)	23°C	3,37 ± 0,33 <sup>NS</sup>	7,75 ± 0,99 <sup>NS</sup>
	28°C	3,00 ± 0,73 <sup>NS</sup>	6,87 ± 1,29 <sup>NS</sup>
Benzocaína (100mg/L)	23°C	5,12 ± 0,72 <sup>NS</sup>	7,62 ± 0,68 <sup>NS</sup>
	28°C	5,00 ± 1,27 <sup>NS</sup>	6,50 ± 1,07 <sup>NS</sup>

NS: não significativo

A temperatura influencia a atividade do peixe, seu consumo de oxigênio e a capacidade de carregamento de oxigênio da água. Com a diminuição da temperatura, o peixe irá se tranquilizar e até ocorrer sua imobilização (ROSS & ROSS, 1999). Entretanto, não houve diferença estatística entre os tempos de indução, entre os anestésicos testados, em ambas as temperaturas. CROUX & MONTAGNA (1998) testaram a concentração de 100mg/L de benzocaína, em bagre, *Pimelodus clarias maculatus*, em duas temperaturas (20°C e 25°C), e obtiveram os mesmos tempos de indução ao anestésico, ou seja, este não foi influenciado pela temperatura, assim como observado neste trabalho.

KILDEA *et al.* (2004) observaram que peixes submetidos a 50 mg/L de óleo de cravo atingiram os mesmo estágios anestésicos, independentes da temperatura da água, visto que nesta concentração os animais perderam o equilíbrio e a agilidade de natação. Segundo os pesquisadores, a não influência da temperatura na ação de óleo de cravo na concentração de 50 mg/L, pode ter sido mascarada pela alta dose do fármaco. Assim, provavelmente isso ocorreu também neste experimento.

De acordo com HOSKONEN & PIRHONEN (2004), houve interação significativa entre a temperatura x concentração nos tempos de indução, em todas as espécies por eles testadas, e entre os tempos de recuperação apenas em uma espécie.

Ainda, segundo estes autores, em temperaturas mais baixas, o tempo de indução anestésica é maior, comparado com maiores temperaturas. MYLONAS *et al.* (2005) constataram que nas temperaturas mais baixas, os tempos de indução e de recuperação são significativamente maiores.

A recuperação de peixes submetidos à anestesia é mais rápida em temperaturas mais altas, já que as altas taxas metabólicas estão associadas às altas temperaturas (HIKASA *et al.*, 1986). Entretanto, segundo CROUX & MONTAGNA (1998), os peixes recuperaram-se mais rapidamente na temperatura mais baixa (20°C). Porém, neste trabalho, não houve diferença significativa entre os tempos de recuperação nas temperaturas testadas.

Provavelmente, esta diferença entre os tempos de indução e de recuperação anestésica, nas duas temperaturas testadas, não foi observada porque a variação de temperatura estudada foi pequena.

Comparando estes dados com os valores do teste preliminar (Tabela 3), pode-se notar que, neste experimento, tanto os tempos de indução quanto os tempos de recuperação do anestésico óleo de cravo apresentaram-se menores em relação aos dados anteriores. Já os resultados da benzocaína apresentaram-se maiores em relação ao teste preliminar. No entanto, os anestésicos apresentaram perfis similares, ou seja, com o óleo de cravo obteve-se menor tempo de indução e maior tempo de recuperação em relação à benzocaína, nas duas temperaturas testadas, assim como ocorreu no teste anterior. Além disso, não houve diferença estatística entre os tempos de indução e de recuperação dos peixes submetidos em ambos anestésicos, corroborando os resultados do teste preliminar. Os pesquisadores HIKASA *et al.* (1986); MUNDAY & WILSON

(1997); KEENE *et al.* (1998); SLADKY *et al.* (2001); PIRHONEN & SCHRECK (2002); WAGNER *et al.* (2002) e WAGNER *et al.* (2003) observaram este mesmo comportamento utilizando óleo de cravo, comparado com peixes expostos ao MS-222.

#### 4.2.3 Análises fisiológicas

Os indicadores mais utilizados para avaliação do estresse são o cortisol e a glicose. O cortisol caracteriza a resposta primária e a glicose, a resposta secundária do estresse (ROBERTSON *et al.*, 1987; BARTON, 2000).

Na tabela 5 encontram-se as médias dos valores de cortisol e glicose dos peixes do grupo controle e tratados com óleo de cravo e benzocaína, em duas temperaturas, a 23°C e a 28°C.

**Tabela 5:** Média dos valores de cortisol e glicose dos peixes do grupo controle e daqueles tratados com óleo de cravo e benzocaína, à 23°C e à 28°C

Animal	Óleo de cravo 28°C	Óleo de cravo 23°C	Benzocaína 28°C	Benzocaína 23°C	Controle 28°C	Controle 23°C
Cortisol (µg/dL)	6,63±0,84 <sup>a</sup>	13,26±3,20 <sup>a</sup>	12,17±1,39 <sup>a</sup>	14,89±4,12 <sup>a</sup>	28,42±3,58 <sup>b</sup>	14,04±2,10 <sup>a</sup>
Glicose (mg/dL)	22,57±3,19 <sup>NS</sup>	24,00±2,65 <sup>NS</sup>	23,28±1,96 <sup>NS</sup>	27,00±1,59 <sup>NS</sup>	24,62±3,41 <sup>NS</sup>	21,62±1,21 <sup>NS</sup>

NS: não significativo

O cortisol é um hormônio liberado através de eventos neuro-endócrinos ligados ao sistema hipotálamo-hipófise-interrenal, que, por sua vez, é ativado por vários tipos de estímulos adversos (DONALDSON, 1981). No processo de estresse, as catecolaminas são liberadas rapidamente frente ao estressor e, juntamente com o cortisol, a insulina, o glucagon e o hormônio tireoidiano, são considerados glicoregulatórias em peixes (FABRI *et al.*, 1998).

Em relação aos resultados do cortisol, os peixes que apresentaram o menor valor deste hormônio foram àqueles submetidos ao óleo de cravo e à benzocaína, na



maior temperatura ( $6,63 \pm 0,84 \mu\text{g/dL}$  e  $12,17 \pm 1,39 \mu\text{g/dL}$ , respectivamente). Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos por estes anestésicos também na menor temperatura ( $13,26 \pm 3,20 \mu\text{g/dL}$  e  $14,89 \pm 4,12 \mu\text{g/dL}$ , respectivamente), assim como nos peixes do grupo controle, na menor temperatura ( $14,04 \pm 2,10 \mu\text{g/dL}$ ). Porém, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tratamento controle, a  $28^\circ\text{C}$ , cuja média do resultado deste hormônio foi de  $28,42 \pm 3,58 \mu\text{g/dL}$ . Ou seja, os anestésicos reduziram o cortisol em ambas as temperaturas deste experimento.

Assim, os dados fisiológicos do cortisol aqui reportados corroboram os resultados de diferentes pesquisadores. WAGNER *et al.* (2003), analisaram os efeitos fisiológicos de anestésicos em peixes, verificando que tanto o óleo de cravo quanto o MS-222 reduziram os níveis de cortisol 10 minutos após a punção caudal, em relação aos peixes não anestesiados. Resultados semelhantes também foram apresentados por STRANGE & SCHRECK (1978).

PIRHONEN & SCHRECK (2002) analisaram os níveis de cortisol e o impacto que o anestésico óleo de cravo tem sobre o peixe. Esses autores notaram que o óleo de cravo não se mostrou um anestésico estressante para *Oncorhynchus mykiss*. Ainda, SMALL (2003), estudando *Ictalurus punctatus*, concluiu que os níveis de cortisol não se alteraram significativamente durante 30 minutos de anestesia com óleo de cravo.

CHO & HEATH (2000) reportaram valores de cortisol ao redor de 200 ng/mL em *Oncorhynchus tshawytscha*, 6 horas após anestesia com MS-222 e óleo de cravo; o nível de cortisol pré-anestésico foi aproximadamente 30 ng/mL. KING *et al.* (2005), aplicando diferentes anestésicos em *Centropomus striata*, entre eles o óleo de cravo e o MS-222, notaram que os peixes de todos os tratamentos apresentaram

significante aumento dos níveis de cortisol plasmático, 10 minutos após exposição às drogas, comparado com os valores basais. Possivelmente, isto ocorreu em resposta à captura e manipulação dos exemplares antes do procedimento anestésico.

A glicemia, uma das respostas fisiológicas secundárias mais utilizadas como indicador de estresse em peixes, aumenta na presença de algum fator estressante, para suprir a maior demanda energética, característica de situações desfavoráveis (MORGAN & IWANA, 1997).

Os valores de glicemia não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Provavelmente, não se observou diferença pois, segundo LAIDLEY & LEATHERLAND (1988), uma significativa hiperglicemia pode ser evidente com 16-32 minutos após o estresse.

Entretanto, o maior valor deste parâmetro ocorreu em peixes anestesiados com benzocaína a 23°C. Esperava-se que este aumento numérico ocorresse nos peixes que apresentaram maiores resultados de cortisol, ou seja, nos peixes do grupo controle a 28°C. Isto porque, o aumento do cortisol é geralmente acompanhado de hiperglicemia, primariamente pelo resultado do aumento da gliconeogênese hepática mantida por proteólise periférica (MOMMSEN *et al.*, 1999). O aumento significativo de glicose sanguínea dos peixes expostos a benzocaína pode ser devido à liberação das catecolaminas (WAGNER *et al.*, 2003).

As médias dos valores de glicose variaram entre  $21,62 \pm 1,21$  mg/L (controle a 23°C) a  $27,00 \pm 1,59$  mg/L (benzocaína a 23°C), sendo estes resultados inferiores ao apresentado por TAVARES-DIAS (2003), para a mesma espécie, que foi  $42,00 \pm 17,20$  mg/dL.

CARNEIRO *et al.* (2001), observaram que o uso da benzocaína contribuiu para a elevação da glicemia e dos níveis plasmáticos do cortisol de peixes após o transporte, sendo registrados efeitos negativos das duas concentrações mais altas (10 e 20mg/L) em vários parâmetros hematológicos e no número do parasito *Piscinoodinium* sp aderidos às brânquias. Estes autores concluíram, portanto, que o uso da benzocaína não reduziu o estresse causado pelo transporte em matrinxãs, *Brycon cephalus*, atuando inclusive como agente estressor adicional.

Exposições prolongadas (15-30 minutos) a baixas concentrações de MS-222 (50 mg/L) elevaram os valores de glicose e sódio a níveis extremamente altos (ISHIOKA, 1984).

GOMES *et al.* (2001), testando diferentes concentrações de benzocaína em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, concluíram que em peixes expostos a altas doses (200 – 350 mg/L) houve aumento significativo do nível de glicose comparado aos expostos a doses baixas. Isso indica que altas concentrações de benzocaína são estressantes para juvenis de tambaqui.

CHO & HEATH (2000), comparando as alterações fisiológicas de peixes anestesiados com MS-222 e com óleo de cravo, não observaram hiperglicemia nos animais tratados. De acordo com estes autores, é interessante notar que, apesar do cortisol atingir níveis significativamente altos, nenhum tratamento promoveu aumento da glicemia, visto que este é associada à elevação dos níveis de cortisol.

SLADKY *et al.* (2001) observaram aumento das concentrações de glicose quando *Piaractus brachypomus* foi anestesiado com MS-222 e óleo de cravo. Contudo, estes pesquisadores não relataram diferenças nos níveis de glicose entre os anestésicos.

#### 4.2.3.1 Análises hematológicas

Os estudos hematológicos das espécies de peixes são de interesse ecológico, fisiológico e patológico. Essas análises auxiliam na compreensão da relação entre as características sanguíneas e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente (LARSON *et al.*, 1976; RAMBHASKAR & SRINIVASA-RAO, 1987).

Quando os peixes são submetidos ao estresse, diversas alterações são observadas nos parâmetros hematológicos (CARNEIRO *et al.*, 2001). Os valores médios dos parâmetros hematológicos – hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (Er), VCM, HCM e CHCM – estão apresentados na tabela 6.

**Tabela 6:** Valores médios e erro padrão dos parâmetros do eritrograma de *O. niloticus* anestesiada com óleo de cravo, benzocaína e não anestesiada (controle), à 23°C e à 28°C

Animal	Óleo de cravo 28°C	Óleo de cravo 23°C	Benzocaína 28°C	Benzocaína 23°C	Controle 28°C	Controle 23°C
Ht(%)	27,75±0,64 <sup>ab</sup>	27,75±0,64 <sup>ab</sup>	27,75±0,64 <sup>ab</sup>	28,00±0,80 <sup>b</sup>	27,25±1,25 <sup>ab</sup>	24,25±0,7 <sup>a</sup>
Hb (g/dL)	6,93±0,59 <sup>NS</sup>	6,97±0,46 <sup>NS</sup>	7,03±0,49 <sup>NS</sup>	7,73±0,56 <sup>NS</sup>	7,14±0,45 <sup>NS</sup>	7,20±0,16 <sup>NS</sup>
Er (10 <sup>4</sup> /μL)	163,44±11,27 <sup>NS</sup>	172,69±15,62 <sup>NS</sup>	173,81±15,31 <sup>NS</sup>	177,12±17,57 <sup>NS</sup>	176,56±13,40 <sup>NS</sup>	151,25±6,20 <sup>NS</sup>
VCM (fL)	1,66±0,12 <sup>NS</sup>	1,65±0,13 <sup>NS</sup>	1,71±0,12 <sup>NS</sup>	1,67±0,16 <sup>NS</sup>	1,61±0,15 <sup>NS</sup>	1,61±0,09 <sup>NS</sup>
HCM (ppg)	0,43±0,02 <sup>NS</sup>	0,42±0,05 <sup>NS</sup>	0,42±0,03 <sup>NS</sup>	0,42±0,03 <sup>NS</sup>	0,42±0,04 <sup>NS</sup>	0,47±0,03 <sup>NS</sup>
CHCM(g/dL)	26,51±2,36 <sup>NS</sup>	25,59±1,43 <sup>NS</sup>	24,59±1,16 <sup>NS</sup>	27,58±2,59 <sup>NS</sup>	26,92±1,27 <sup>NS</sup>	30,01±1,35 <sup>NS</sup>

NS: não significativo

Médias com letras distintas na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,5$ ).

Segundo TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998), o hematócrito é índice do eritrograma que apresenta o menor coeficiente de variação em peixes, sugerindo ser um bom indicador dos efeitos dos diversos fatores ambientais a que os peixes estão sujeitos. No presente trabalho, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para o hematócrito entre os peixes submetidos à benzocaína ( $28,00 \pm 0,80$  %) e os do controle ( $24,25 \pm 0,74$  %), ambos

a 23°C. Ou seja, os animais não anestesiados apresentaram o menor valor deste parâmetro, provavelmente ocasionado pela contração das células vermelhas. Entretanto, FERREIRA *et al.* (1981), não relataram diferenças entre os valores de hematócrito em *Cyprinus carpio* anestesiados com 100 mg/L de benzocaína.

De acordo com McDONALD & MILLIGAN (1997), o estresse provoca hemoconcentração em muitos peixes de água doce, o que pode ser observado através da elevação do hematócrito. Já, PETERSON (1990) diz que o aumento do hematócrito é geralmente observado como resultado do inchaço do eritrócito, diminuição do volume plasmático, aumento do número de células vermelhas ou uma combinação destes fatores.

Em relação aos peixes submetidos ao óleo de cravo, não se verificou diferença estatística neste parâmetro, corroborando os resultados de WAGNER *et al.* (2003), que não verificaram alterações nos níveis de hematócrito de peixes anestesiados com óleo de cravo e MS-222. Já, SLADKY *et al.* (2001) relataram aumento dos níveis de hematócrito e da taxa de hemoglobina quando *Piaractus brachypomus* foi anestesiado com 50 e 100 mg/L de eugenol.

Analisando os valores do hematócrito deste experimento e comparando-os com dos outros pesquisadores, com a mesma espécie de peixe, *O. niloticus*, nota-se que estes resultados corroboram os dados descritos por UEDA *et al.* (1997), TAVARES-DIAS *et al.* (2000, 2002), HISANO *et al.* (2003) e TAVARES-DIAS (2003). E estes valores apresentam-se menores comparados aos dados reportados por ALKAHEM (1994), SUN *et al.* (1994) e RODRIGUES *et al.* (2002).

A hemoglobina é uma proteína conjugada composta por quatro grupamentos protéicos, a globina, e por um grupamento heme, cujo principal composto químico é o ferro (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994). O grupamento heme é idêntico em

todas as espécies estudadas, mas a proteína globina difere de espécie para espécie (VAL & ALMEIDA-VAL, 1995).

Os peixes tratados com benzocaína à 23°C e os do grupo controle, a 28°C e a 23°C, apresentaram os maiores valores da taxa de hemoglobina ( $7,73 \pm 0,56$  g/dL;  $7,14 \pm 0,45$  g/dL e  $7,20 \pm 0,16$  g/dL, respectivamente); já os animais anestesiados com óleo de cravo, à 23°C e à 28°C, apresentaram os menores valores ( $6,97 \pm 0,46$  g/dL e  $6,93 \pm 0,59$  g/dL, respectivamente). A maior taxa de hemoglobina foi observada nos animais do grupo controle e dos tratados com benzocaína, sugerindo que ocorreu aumento da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, para suprir a demanda energética em função do estresse presente (NIKINMAA *et al.*, 1983). No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A variação da concentração de hemoglobina foi similar aos valores reportados, para a mesma espécie, por DABROWSKA *et al.* (1989), ALKAHEM (1994), UEDA *et al.* (1997), TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998) e TAVARES-DIAS *et al.* (2000) e menores comparados aos resultados de SUN *et al.* (1994) e RODRIGUES *et al.* (2002).

Segundo VAL *et al.* (1990), peixes submetidos a baixos níveis de oxigênio exibem elevados valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos, provavelmente para carrear mais eficientemente o pouco gás disponível.

Os eritrócitos são células elípticas com o núcleo central geralmente no formato da célula, têm cromatina compactada e citoplasma acidófilo ocupando a maior parte da célula (UEDA *et al.*, 2001; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2003). A função dessas células consiste no transporte do oxigênio e do gás carbônico, desempenhado pelo seu componente principal, a hemoglobina (WELLS *et al.*, 1980).

A contagem de eritrócitos variou entre  $151,25 \pm 6,20 \times 10^4/\mu\text{L}$  (controle a  $23^\circ\text{C}$ ) e  $177,12 \pm 17,57 \times 10^4/\mu\text{L}$  (benzocaína a  $23^\circ\text{C}$ ), ou seja, seus maiores valores foram observados nos peixes tratados com benzocaína. Este aumento do número de eritrócitos pode ser explicado pela redução dos níveis de oxigênio, causado pela redução da irrigação branquial (LOWE-JINDE & NIIMI, 1983). Além disso, este aumento do número de eritrócitos também é marcado pela diminuição do volume celular (VCM). No entanto, estes valores não apresentaram diferenças significativas entre as temperaturas e entre os anestésicos.

Os resultados apresentados neste trabalho concordam com os resultados obtidos, para a mesma espécie estudada, por TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998), ADEPARUSI & AJAYI (2000), RODRIGUES *et al.* (2002) e HISANO *et al.* (2003).

O Volume Corpuscular Médio (VCM), expressa o volume médio dos eritrócitos. Nos grupos controle, o valor médio do VCM apresentou-se numericamente menor comparado aos demais grupos. Isso pode ser explicado pelo fato de estar ocorrendo uma liberação de eritrócitos na corrente sangüínea pelo estímulo estressor (McDONALD & MILLIGAN, 1997), visto que nestes grupos os animais foram submetidos à coleta de sangue sem anestésico. Entretanto, esta diferença não foi evidenciada no teste estatístico aplicado. A variação do VCM mostrou-se entre  $1,61 \pm 0,09$  fL (controle a  $23^\circ\text{C}$ ) e  $1,71 \pm 0,12$  fL (benzocaína a  $28^\circ\text{C}$ ). Esses resultados foram semelhantes aos apresentados por peixes da mesma espécie, por RODRIGUES *et al.* (2002), BITTENCOURT *et al.* (2003) e HISANO *et al.* (2003). Já, os valores obtidos neste trabalho apresentaram-se menores quando comparados com os resultados de UEDA *et al.* (1997) e maiores em relação aos dados de ALKAHEM (1994), ambos para a mesma espécie.

A Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) dá uma noção sobre o peso médio da hemoglobina dentro dos eritrócitos. Neste trabalho, a variação de HCM não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, o maior valor observado neste índice foi em peixes do grupo controle, a 23°C, cujo valor foi  $0,47 \pm 0,03$  ppg, uma vez que os peixes deste tratamento apresentaram o menor valor de hematócrito do experimento. As médias dos dados obtidos neste parâmetro hematológico corroboram os resultados de ALKAHEM (1994) e TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998). E foram maiores comparados com UEDA *et al.* (1997).

A Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), determina o peso da hemoglobina em 100 mL de sangue (RANZANI-PAIVA & SOUZA-SILVA, 2004). A variação de CHCM foi de  $24,59 \pm 1,16$  g/dL (benzocaína à 28°C) e  $30,01 \pm 1,35$  g/dL (controle à 23°C), sendo os maiores resultados obtidos em peixes anestesiados com benzocaína a 23°C e nos animais do grupo controle, em ambas as temperaturas. Estes aumentos nos valores do CHCM podem ser explicados pelo aumento observado nestes mesmos tratamentos, da concentração de hemoglobina, visto que este índice e a taxa de hemoglobina são diretamente proporcionais. Os valores obtidos de CHCM no presente trabalho corroboram os resultados obtidos, para *O. niloticus*, por DABROWSKA *et al.* (1989), UEDA *et al.* (1997), TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998), ADEPARUSI & AJAYI (2000), TAVARES-DIAS *et al.* (2000), RODRIGUES *et al.* (2002) e TAVARES-DIAS *et al.* (2002).

As variações encontradas entre os elementos sangüíneos obtidos, neste experimento, para *O. niloticus*, e os dados reportados por outros pesquisadores, para a mesma espécie, podem ser explicadas pelas diferenças de peso, idade e comprimento dos peixes utilizados nos diversos trabalhos (TAVARES-DIAS *et al.*, 2000), além do estado



nutricional, de doenças e do ciclo sazonal (RANZANI-PAIVA, 1991). As diferenças nas metodologias empregadas na colheita de sangue também podem ser fatores de variações quantitativas desses valores, visto que o tipo de anti-coagulante utilizado neste processo pode atuar como fonte de alteração de resultados (TAVARES-DIAS *et al.*, 2000). Segundo TAVARES-DIAS & SANDRIN (1998), a colheita de sangue com heparina resulta em valores maiores de hematócrito e da taxa de hemoglobina, comparados aos encontrados no sangue colhido com EDTA, para o mesmo animal.

Assim, como a única diferença estatística observada na tabela 8 foi a variação dos valores de hematócrito de peixes anestesiados com benzocaína comparado com o controle, ambos a 23°C, não permite sugerir que tal parâmetro seja indicador de respostas ao estresse ocasionado pelo emprego do fármaco. ISHIOKA (1984), observando os efeitos do anestésico MS-222 nos constituintes sangüíneos de *Pagrus major*, concluiu que o fármaco empregado não produziu qualquer alteração nos parâmetros hematológicos comparado com os valores de peixes do grupo controle (não anestesiados), em pelo menos 10 minutos após o tratamento aplicado, corroborando os resultados deste trabalho.

Já, os peixes submetidos ao óleo de cravo não apresentaram diferença significativa em nenhum dos parâmetros hematológicos analisados na tabela 6, corroborando os resultados apresentados por TORT *et al.* (2002), cujo organismo-teste foi *Sparus aurata*. Por isso, esses dados confirmam a eficácia do óleo de cravo, indicando que este fármaco não causa danos à capacidade que as células vermelhas têm de carrear oxigênio (TORT *et al.*, 2002).

É importante salientar que, neste trabalho, não foi identificado o sexo dos animais participantes das análises, portanto, não é sabido se as variações

hematológicas foram influenciadas pelas diferenças entre machos e fêmeas. Entretanto, TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998), demonstraram que, em *O. niloticus*, a contagem total de eritrócitos, a taxa de hemoglobina, o percentual de hematócrito, assim como as constantes corpusculares e o percentual de trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos, não foram influenciados pelo sexo.

Além disso, a literatura sugere que pode haver variações dos elementos sangüíneos frente a fatores como a temperatura (RANZANI-PAIVA, 1991). Segundo HOUSTON & DeWILDE (1968), as baixas temperaturas podem causar eritropenia, aumento do VCM e o percentual de hematócrito. Porém, neste trabalho, os resultados sugerem que não houve influência da temperatura sobre os níveis hematológicos, corroborando os dados de TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998).

Observações microscópicas das lâminas de extensão revelaram a presença de, além dos eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Os valores absolutos destas células sanguíneas analisadas nos peixes tratados encontram-se nas tabelas 7 e 8.

**Tabela 7:** Valores médios e erro padrão dos trombogramas de *O. niloticus* anestesiada com óleo de cravo, benzocaína e não anestesiados (controle), à 23°C e à 28°C

Tratamentos	Trombócitos
Óleo de cravo - 28°C	11276,18 ± 4740,87 <sup>NS</sup>
Óleo de cravo - 23°C	15283,14±2618,62 <sup>NS</sup>
Benzocaína - 28°C	16846,36±2623,60 <sup>NS</sup>
Benzocaína - 23°C	11170,52 ± 2408,73 <sup>NS</sup>
Controle - 28°C	19813,86 ± 3406,08 <sup>NS</sup>
Controle - 23°C	11614,55 ± 3554,00 <sup>NS</sup>

NS: não significativo

A variação do número de trombócitos, neste trabalho foi de  $11170,52 \pm 2408,73$  trombócitos/ $\mu\text{L}$  (benzocaína a  $23^\circ\text{C}$ ) a  $19813,86 \pm 3406,08$  trombócitos/ $\mu\text{L}$  (controle a  $28^\circ\text{C}$ ). E, de acordo com os resultados do teste estatístico aplicado, não houve diferença entre os números de trombócitos entre todos os tratamentos. Esses resultados foram muito inferiores aos verificados por TAVARES-DIAS (2003), para a mesma espécie, cujos números foram  $48902,50 \pm 21366,10/\mu\text{L}$  de trombócitos e por UEDA *et al.* (1997), cuja variação de trombócitos totais foi entre  $38540,00 - 100800,00/\mu\text{L}$ . Segundo TAVARES-DIAS & MORAES (2004), além da variação interespecífica, as diferenças nas metodologias empregadas na contagem de trombócitos também são responsáveis pela grande variação dos dados descritos na literatura.

Muito pouco tem se revelado em relação à morfologia e às propriedades funcionais destas células; e dados disponíveis sobre a percentagem de trombócitos no sangue periférico de peixes são escassos, uma vez que é difícil a identificação entre linfócitos e trombócitos (UEDA *et al.*, 2001).

Alguns autores atribuem algumas funções destas células nos peixes, entre elas, sugere-se que têm importante papel no processo de coagulação (CASILLAS & SMITH, 1977) e realizam fagocitose, ajudando a manter os peixes livres de patógenos após dano vascular (HILL & ROWLEY, 1996). Essa grande diversidade de formas reflete tanto sua especificidade quanto os diferentes estágios de seu desenvolvimento (KALASHNIKOVA, 1976).

Os trombócitos dos peixes têm sido descritos como as células sanguíneas mais abundantes, depois dos eritrócitos (UEDA *et al.*, 2001). Entretanto, em todos os tratamentos deste estudo, o número de trombócitos foi menor em relação ao número de leucócitos (Tabela 8).

A fisiologia dos leucócitos e os mecanismos de controle de funcionamento do sistema leucocitário dos peixes são semelhantes aos dos vertebrados superiores (VOLKOV, 1978). Embora os trombócitos e os leucócitos sejam células de linhagens diferentes, sob o ponto de vista da Patologia, esses têm sido agrupados na contagem relativa e denominadas células sanguíneas de defesa orgânica (TAVARES-DIAS *et al.*, 1999; 2000).

Em relação aos leucócitos foram observados linfócitos, neutrófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos, corroborando as análises observadas por UEDA *et al.* (1997; 2001), em *Oreochromis niloticus*. O critério utilizado para definir a nomenclatura destas células foi baseado nos aspectos morfológicos do núcleo e a distribuição padrão dos grânulos citoplasmáticos. Os valores absolutos e percentuais encontrados para os diferentes leucócitos encontram-se na tabela 8.

**Tabela 8:** Valores totais dos diferentes leucócitos observados nas extensões sanguíneas de *O. niloticus* exposta ao óleo de cravo e à benzocaína em diferentes temperaturas

Tipos celulares	Óleo de cravo		Benzocaína		Controle	
	28°C	23°C	28°C	23°C	28°C	23°C
<b>Leucócitos totais/μL</b>	17068,50±1817,60 <sup>NS</sup>	21381,80±3532,51 <sup>NS</sup>	19258,43±2243,80 <sup>NS</sup>	27596,6 ±4925,13 <sup>NS</sup>	19813,86±3406,08 <sup>NS</sup>	21058,10±2960,90 <sup>NS</sup>
<b>linfócitos/μL</b>	12896,88±1485,70 <sup>NS</sup>	17091,99±2761,60 <sup>NS</sup>	15987,73±2085,20 <sup>NS</sup>	21793,54±3671,80 <sup>NS</sup>	17561,86±2447,10 <sup>NS</sup>	18423,38±2736,80 <sup>NS</sup>
<b>(%)</b>	79,86±4,52 <sup>NS</sup>	79,62±2,97 <sup>NS</sup>	82,73±2,13 <sup>NS</sup>	79,94±2,37 <sup>NS</sup>	84,14±3,32 <sup>NS</sup>	83,35±3,02 <sup>NS</sup>
<b>neutrófilos/μL</b>	2947,65±756,89 <sup>NS</sup>	3518,64±610,41 <sup>NS</sup>	2779,02±429,92 <sup>NS</sup>	5119,68±1434,40 <sup>NS</sup>	2870,25±863,65 <sup>NS</sup>	2827,58±430,48 <sup>NS</sup>
<b>(%)</b>	17,82±4,54 <sup>NS</sup>	16,67±2,39 <sup>NS</sup>	14,67±2,04 <sup>NS</sup>	17,39±2,48 <sup>NS</sup>	13,13±2,80 <sup>NS</sup>	13,97±2,67 <sup>NS</sup>
<b>monócitos/μL</b>	344,88±82,31 <sup>NS</sup>	699,46±132,78 <sup>NS</sup>	475,05±140,16 <sup>NS</sup>	667,84±83,63 <sup>NS</sup>	551,60±211,97 <sup>NS</sup>	533,87±115,19 <sup>NS</sup>
<b>(%)</b>	2,07±0,42 <sup>NS</sup>	3,36±0,66 <sup>NS</sup>	2,51±0,77 <sup>NS</sup>	2,59±0,28 <sup>NS</sup>	2,45±0,61 <sup>NS</sup>	2,48±0,51 <sup>NS</sup>
<b>basófilos/μL</b>	35,32±21,69 <sup>NS</sup>	71,77±26,77 <sup>NS</sup>	16,63±16,63 <sup>NS</sup>	15,51±15,51 <sup>NS</sup>	37,13±24,00 <sup>NS</sup>	54,19±26,71 <sup>NS</sup>
<b>(%)</b>	0,25±0,11 <sup>NS</sup>	0,35±0,15 <sup>NS</sup>	0,09±0,09 <sup>NS</sup>	0,08±0,08 <sup>NS</sup>	0,21±0,16 <sup>NS</sup>	0,20±0,10 <sup>NS</sup>
<b>eosinófilos/μL</b>	0	0	0	0	12,09±12,09 <sup>NS</sup>	0
<b>(%)</b>	0	0	0	0	0,07±0,08 <sup>NS</sup>	0

NS: não significativo

O número de leucócitos totais variou de  $17068,50 \pm 1817,60/\mu\text{L}$  (óleo de cravo a  $28^\circ\text{C}$ ) a  $27596,60 \pm 4925,13/\mu\text{L}$  (benzocafina a  $23^\circ\text{C}$ ). E, de acordo com os resultados do teste estatístico aplicado, não houve diferença entre os números de leucócitos entre todos os tratamentos. Esses resultados corroboram os de UEDA *et al.* (1997), cuja variação de leucócitos totais ( $\mu\text{L}$ ), para *O. niloticus*, foi entre 7300,00 – 21470,00/ $\mu\text{L}$  de leucócitos. Entretanto, os dados do presente trabalho foram inferiores aos verificados por TAVARES-DIAS (2003), para a mesma espécie, cujos números foram  $66947,50 \pm 33889,80/\mu\text{L}$  de leucócitos.

Os teleósteos regulam suas características sangüíneas de acordo com as condições ambientais e conseqüentemente, o impacto desses fatores abióticos pode influenciar tais características (TAVARES-DIAS, 2003). LUSKOVÁ (1997), relata que em *Salmo trutta*, *Thymallus thymallus* e *Chondrostoma nasus* a contagem de leucócitos foi influenciada pela temperatura ambiental. Entretanto, neste estudo, a temperatura não influenciou o número total destas células.

Estas variações inter-específicas podem ser interpretadas como alterações naturais de cada espécie. Tais resultados já foram demonstrados por RANZANI-PAIVA *et al.* (1998/1999), ao analisar os leucócitos de três espécies provenientes do mesmo ambiente, mas em diferentes idades, concluindo que as diferenças foram espécie-específicas.

Além disso, essas controvérsias de resultados podem ser devido a erros de identificação ocasionada por falha do corante graças à interferência do anticoagulante heparina e ao fato de que nesta pesquisa não foram utilizados métodos citoquímicos como complementação (TAVARES-DIAS, 2003).

Os tipos celulares de leucócitos mais abundantes encontrados nos exemplares de *O. nicotilus*, neste trabalho, foram linfócitos e neutrófilos, corroborando os resultados demonstrados em outras espécies de teleósteos como *Pimelodus maculatus* (RIBEIRO, 1978), *Synbranchus marmoratus* (NAKAMOTO *et al.*, 1991), *Mugil platanus* (RANZANI-PAIVA, 1995) e *Oncorhynchus mykiss* (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1998).

Os maiores valores absolutos de linfócitos foram encontrados em peixes submetidos ao processo de colheita de sangue sem anestésico e nos tratados com benzocaína na menor temperatura. Ou seja, esta variação foi de  $12896,88 \pm 1485,70/\mu\text{L}$  (óleo de cravo a 28°C) a  $21793,54 \pm 3671,80/\mu\text{L}$  (benzocaína a 23°C). Entretanto, estas diferenças foram apenas numéricas, uma vez que não apresentaram diferenças estatísticas.

A variação na porcentagem de linfócitos foi de  $79,86 \pm 4,52 \%$  (óleo de cravo a 28°C) a  $84,14 \pm 3,32 \%$  (controle a 28°C), concordando com os valores apresentados por ALKAHEM (1994). TAVARES-DIAS (2003) apresentou valores de linfócitos, para a mesma espécie aqui estudada, muito inferior ( $49,0 \pm 14,7 \%$ ).

Os linfócitos, geralmente esféricos, variam quanto à forma e tamanho, sendo classificados em linfócitos grandes e pequenos. Os linfócitos grandes apresentam cromatina condensada em grumos e citoplasma basófilo escasso, com prolongamentos apresentando expansões terminais e poucos grânulos azurófilos grandes próximos ao núcleo. Os linfócitos pequenos apresentam cromatina condensada homogênea e citoplasma basófilo escasso, desprovidos de grânulos e com alguns prolongamentos (VEIGA *et al.*, 2000). Entretanto, neste trabalho, não foram distinguidos os linfócitos em tamanhos, já que ELLIS (1977), afirmou que a distinção dos linfócitos em grandes e pequenos é arbitrária e,

provavelmente, representa diferentes estágios funcionais de uma mesma população celular e não populações distintas.

Em relação à função destas células nos peixes, ELLIS (1977), atribuiu a essas células a característica de serem imunocompetentes, e de atuarem na defesa contra infecções por protozoários e helmintos (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

Os menores valores absolutos de neutrófilos foram obtidos em peixes submetidos ao tratamento sem anestésico em ambas as temperaturas. Já, o maior resultado deste foi apresentado por tilápias tratadas com benzocaína a 23°C, cujo valor foi de  $5119,68 \pm 1434,40/\mu\text{L}$ . Porém, estes dados não se mostraram diferentes estatisticamente.

A variação da porcentagem de neutrófilos foi de  $13,13 \pm 2,80 \%$  (controle a 28°C) a  $17,82 \pm 4,54 \%$  (óleo de cravo a 28°C). TAVARES-DIAS (2003) apresentou valor, para a mesma espécie aqui estudada, maior de neutrófilo ( $44,80 \pm 14,20 \%$ ).

Os neutrófilos são intitulados por vários sinônimos como heterófilo (YOKOYAMA, 1960), leucócito polimorfonuclear (ANDERSON & ROBERTS, 1975) e granulócito tipo I (DOGGETT & HARRIS, 1989). São células arredondadas, com núcleo excêntrico que pode variar de forma, desde circular até segmentado, com cromatina compacta, e citoplasma abundante e é fracamente corado pela eosina e se observam grânulos (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2003).

Segundo McARTHUR *et al.* (1985), a capacidade dos polimorfonucleares e monomorfonucleares de mobilizarem-se rapidamente para o local da injúria servem para minimizar a expansão das doenças e iniciar a resposta imune. RIBEIRO (1978); DOGGETT & HARRIS (1989) consideram os neutrófilos como as maiores células fagocíticas, visto que ingerem tanto partículas de carbono com bactérias.



MAHAJAN & DHEER (1979), concluíram que os neutrófilos são os leucócitos mais importantes e têm grande sensibilidade a modificações do meio ambiente. Assim, sua caracterização e identificação são essenciais para a avaliação das alterações do estado fisiológico dos peixes.

CARNEIRO *et al.* (2001), avaliando o estresse de matrinxãs submetidos ao transporte com benzocaína, observaram decréscimo da porcentagem de linfócitos após o transporte e aumento significativo da porcentagem de neutrófilos, desde a chegada até 24 horas após o transporte. Já a porcentagem de monócitos não apresentou diferenças significativas, oscilando entre 5 e 9%. Para confirmar a linfopenia que ocorre em peixes estressados, JOHANSSON-SJOBECK *et al.* (1978), administraram cortisol através da alimentação, observando significativa linfopenia e neutrofilia. Segundo McLEAY (1975), a linfopenia (redução do número de linfócitos) e a neutrofilia (aumento do número de neutrófilos) é resposta comum de estresse agudo.

Esta resposta ao estresse não ocorreu nos peixes analisados neste estudo, visto que a variação do número de linfócitos apresentou-se maior comparado com resultados de TAVARES-DIAS (2003), e a variação do número de neutrófilos mostrou-se inferior, em relação ao autor citado. Além disso, neste estudo, não foram observadas variações significativas, entre os tratamentos, dos valores percentuais de leucócitos e neutrófilos, corroborando os resultados de CHO & HEATH (2000).

Os maiores valores absolutos de monócitos foram observados nos peixes tratados com óleo de cravo e naqueles tratados com benzocaína, ambos a 23°C ( $699,46 \pm 132,78/\mu\text{L}$  e  $667,84 \pm 83,63/\mu\text{L}$ , respectivamente). Já, o menor valor foi obtido em peixes submetidos

ao óleo de cravo a 28°C ( $344,88 \pm 82,31/\mu\text{L}$ ). Porém, não se observou diferença estatística entre os tratamentos.

Os monócitos variaram de  $2,07 \pm 0,42 \%$  (óleo de cravo a 28°C) a  $3,36 \pm 0,66 \%$  (óleo de cravo a 23°C). Estes valores estão de acordo com aqueles encontrados por RANZANI-PAIVA *et al.* (1998) e TAVARES-DIAS & MORAES (2003).

Os monócitos são células grandes, que variam quanto à forma e apresentam núcleo volumoso, ocupando, aproximadamente, dois terços da célula. O citoplasma tem discreta basofilia, com vacúolos. Estas células podem fagocitar bactéria circulante e vírus (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2003). Sob condições apropriadas, saem do sistema vascular e completam sua maturação, tornando-se macrófagos maduros, nos tecidos (MORROW & PULSFORD, 1980). Assim, os monócitos são células relativamente imaturas presentes no tecido hematopoiético e na circulação sanguínea (UEDA *et al.*, 2001).

Em relação à função dos monócitos, IMAGAWA *et al.* (1989) observaram a capacidade destas células de ingerir partículas de carbono, corroborando com os resultados de ELLIS (1976); FERGUNSON (1976); DOGGETT & HARRIS (1989).

Em relação ao número absoluto de basófilos, nota-se que os menores valores foram encontrados em peixes submetidos a benzocaína, em ambas as temperaturas ( $15,51 \pm 15,51/\mu\text{L}$  e  $16,63 \pm 16,63/\mu\text{L}$ , a 23°C e a 28°C, respectivamente). E o maior valor foi observado nos peixes tratados com óleo de cravo a 23°C ( $71,77 \pm 26,77/\mu\text{L}$ ). Apesar disso, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Neste estudo, os basófilos foram raramente observados, variando de  $0,08 \pm 0,08 \%$  (benzocaína a 23°C) a  $0,35 \pm 0,15 \%$  (óleo de cravo a 23°C), corroborando os

resultados de UEDA *et al.* (1997), RANZANI-PAIVA *et al.* (1998) e TAVARES-DIAS & MORAES (2003), cuja variação de basófilos de *Tilapia rendalli* foi de 0 a 1%.

Os basófilos são esféricos, com citoplasma rico em grânulos basofílicos de vários tamanhos e apresentam metacromasia. O núcleo é esférico e roxo. Às vezes, a linha nuclear não pode ser distingida devido à presença destes grânulos (UEDA *et al.*, 2001).

A função dos basófilos dos peixes ainda não está definida e parece estar ligada aos processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (ROBERTS, 1981). Até agora, esta célula não tem sido implicada em nenhum mecanismo de defesa conhecido, em peixes (RANZANI-PAIVA, 1995).

Os eosinófilos só foram encontrados nos peixes do grupo controle, sendo  $12,09 \pm 12,09/\mu\text{L}$  seu valor absoluto. Entretanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Eosinófilos também foram escassos neste estudo, assim como em RANZANI-PAIVA *et al.* (1998), TAVARES-DIAS *et al.* (2000) e TAVARES-DIAS & MORAES (2003). Já TAVARES-DIAS (2003), não encontrou estas células em *O. niloticus*.

Os eosinófilos são células arredondadas, normalmente com núcleo excêntrico e citoplasma com grânulos eosinofílicos (UEDA *et al.*, 2001; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2003). Em alguns peixes, estas células sugerem ser fagocítica (HINE & WAIN 1989; SUZUKI, 1986) e aparecem em maior número em infecções parasitárias e inflamações (LESTER & DESSER, 1975; LESTER & DANIELS, 1976).

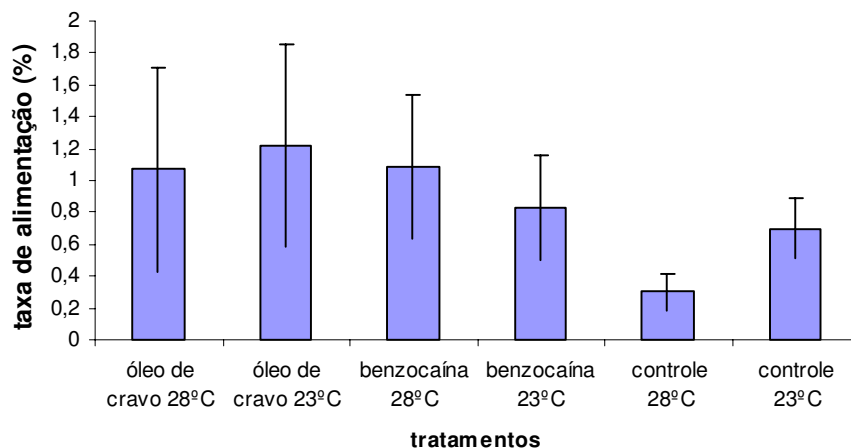
BITTENCOURT *et al.* (2003), não encontraram basófilos ou eosinófilos, nem seus precursores, no sangue periférico de *O. niloticus*, criados em sistema semi-intensivo.

Basófilos e eosinófilos são geralmente escassos no sangue de peixes, mas estudos de PITOMBEIRA & MARTINS (1970) e EZZAT *et al.* (1974), indicam que estes estão presentes em algumas espécies de peixes. De acordo com BOOMKER (1981), apesar de ser geralmente aceito que a maioria dos helmintos provoca uma reação eosinofílica, nenhum eosinófilo foi encontrado em catfish parasitados por nematodas. Nos estudos de RANZANI-PAIVA *et al.* (2000), a maior porcentagem de eosinófilos foi encontrada em *S. borelli* não parasitados.

#### **4.2.4 Tempo de retorno á alimentação**

O consumo de alimento e o comportamento alimentar são geralmente considerados critérios seguros para avaliar a saúde e o bem-estar dos peixes criados em cativeiro (JOBBLING *et al.*, 2001). Existem vários métodos para monitorar o consumo alimentar de peixes (JOBBLING *et al.*, 1995) e o método baseado na coleta do excesso de ração já foi descrito por HELLAND *et al.* (1996) e BENDIKSEN *et al.* (2002).

Na figura 7 encontram-se as médias dos valores da taxa de alimentação (% ração/peso dos animais) dos peixes do grupo controle, dos anestesiados com óleo de cravo e com benzocáína, à 23°C e à 28°C.



**Figura 7:** Média das taxas de alimentação (%) de *O. niloticus*, submetido à anestesia por benzocaína e óleo de cravo, além do grupo controle, em diferentes temperaturas

Foram ofertados aos animais, 24 horas após o procedimento de anestesia e coleta sanguínea, 3,00 % da média corporal dos peixes, de ração comercial. Os peixes submetidos ao óleo de cravo a 28°C comeram  $1,07 \pm 0,64$  % e os submetidos ao mesmo anestésico, na menor temperatura, alimentaram-se de  $1,22 \pm 0,63$  % de ração. Já, as tilápias anestesiadas com benzocaína a 28°C, comeram  $1,09 \pm 0,45$  %, e aquelas tratadas a 23°C,  $0,83 \pm 0,33$  %. Em relação aos peixes submetidos à retirada de sangue sem nenhum anestésico, na maior temperatura, ingeriram apenas  $0,30 \pm 0,12$  % de ração e a 23°C,  $0,70 \pm 0,19$  %. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre o consumo alimentar entre todos os tratamentos, em ambas as temperaturas.

Calculou-se também a média da quantidade de ração (em mg) pela média do peso (em g) dos peixes participantes deste experimento. Para os animais submetidos ao óleo de cravo, o consumo alimentar variou de 3,55 – 4,47 mg/g, a 23°C e a 28°C, respectivamente. Já, os peixes tratados com benzocaína esta variação foi de 3,24 – 4,37 mg/g, a 23°C e a 28°C, respectivamente. Em relação as tilápias submetidas ao processo sem anestésico, os resultados

foram de 1,13 – 2,67 mg/g, a 28°C e a 23°C, respectivamente. Estes valores foram baixos comparados com os dados apresentados por SORUM & DAMSGARD (2004), anestesiando salmão do Atlântico com 50 mg/L de benzocaína.

Apesar de não se observar diferença estatística entre os resultados, nota-se que, neste experimento, os peixes submetidos aos tratamentos com óleo de cravo apresentaram maior taxa de alimentação comparado com os outros tratamentos. Já, PIRHONEN & SCHRECK (2002), analisando o impacto do anestésico sobre a alimentação, notaram que o consumo de ração dos peixes tratados com óleo de cravo foi menor, confrontado com os animais anestesiados com dióxido de carbono.

SORUM & DAMSGARD (2004) avaliaram o consumo de ração de peixes anestesiados com 50 mg/L de benzocaína em dois tempos diferentes, ou seja, animais anestesiados por um curto tempo (3 min) e por longo período (15 min). Esses pesquisadores observaram que, nos dois tempos de indução anestésica, não houve diferença estatística comparados ao grupo controle (sem anestésico) no consumo de ração. No entanto, no primeiro e no segundo dia após a experimentação, os peixes submetidos ao anestésico comeram 20% menos ração comparado com aqueles que não foram anestesiados. No terceiro dia depois do tratamento, os peixes submetidos ao anestésico com curto período de indução comeram 9% mais ração que aqueles do grupo controle, indicando uma pequena compensação da taxa de crescimento deste grupo. Todavia, neste trabalho não foi possível fazer esta análise, uma vez que o teste de alimentação só foi realizado no primeiro dia após o tratamento com anestésico.

SOTO & BURHANUDDIN (1995), observaram que a maioria de *Siganus lineatus* alimentou-se poucas horas após anestesia com óleo de cravo e PRINCE & POWELL (2000), reportaram que adultos de truta arco-íris alimentaram-se ativamente

somente uma semana após a anestesia. Assim, a baixa taxa de arraçoamento observada neste estudo, pode ser explicada pela rapidez da alimentação, uma vez que foi fornecida ração para estes animais 24 horas após sofrerem o processo de anestesia.

## 5. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, pode-se concluir que, para juvenis de *Oreochromis niloticus*, a concentração ideal, para manipulações invasivas, é de 100 mg/L de benzocaína e de 80 mg/L de óleo de cravo.

Além disso, observou-se que os peixes submetidos ao óleo de cravo apresentaram menor tempo de indução e maior tempo de recuperação ao anestésico, em relação àqueles tratados com benzocaína.

Os diferentes anestésicos e a temperatura não influenciaram os tempos de indução e de recuperação, assim como o tempo de retorno à alimentação.

A aplicação do anestésico teve influência apenas no valor do hematócrito e no de cortisol, minimizando os efeitos relacionados ao estresse.

Assim, recomenda-se, para procedimentos longos, a utilização do anestésico óleo de cravo, já que o tempo de recuperação dos peixes submetidos a ele é maior comparado com a benzocaína.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEPARUSI, E. O.; ATAYI, A. D. Hematological characteristics of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed differently processed lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) dits. In: Proceeding from the Fifth International Symposium on Tilapia **Aquaculture**, p. 131-137, 2000.
- ALKAHEM, H. F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on hematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. **J. Univers. Kuwait**, v. 21, p. 243-252, 1994.
- ALLEN, J. L. Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. **Prog. Fish-Cult.**, v. 50 n. 1, p. 59-60, 1988.
- ALLYN, M. L.; SHEEHAN, R. J.; KOHLER, C. C. The effects of capture and transportation stress on white bass semen osmolarity and their alleviation via sodium chloride. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 130, n. 4, p. 706-711, 2001.
- ANDERSON, C. D.; ROBERTS, R. J. A comparison of the affects of temperature on wound healing in a tropical and temperature teleost. **J. Fish Biol.**, v. 7, p. 173-182, 1975.
- ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North Am. J. Fish. Manage.**, v. 17, p. 301-307, 1997.
- BARHAM, W. T.; CAIGER, K. M.; VISSER, J. G. J. The use of benzocaine hydrochloride as fish tranquillizer and anaesthetic in saline waters. **J. Limnol. Soc. sth. Afr.** v. 5 n. 2, p. 94-96, 1979.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North Am. J. Aquacul.**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000.
- BARTON, B. A.; ZITZOW, R. E. Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. **Prog. Fish-Cult.**, v. 57, p. 267-276, 1995.

- BENDIKSEN, E. A.; JOBLING, M.; ARNESEN, A. M.; Feed intake of Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., in relation to temperature and feed composition. **Aquac. Res.**, v. 33, p. 525-532, 2002.
- BITTENCOURT, N. L. R.; MOLINARI, L. M.; SCOARIS, D. O.; PEDROSO, R. B.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; ABREU FILHO, B. A.; DIAS FILHO, B. P. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 2, p. 385-389, 2003.
- BOOMKER, J. The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of South African freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. **J. Vet. Res.**, v. 48, p. 185-193, 1981.
- BOOTH, N. H. Drug and chemical residues in the edible tissues of animals. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. (Eds.). **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 6<sup>th</sup> ed. Iowa State Univ. Press, Iowa, p. 1149-1159, 1988.
- BOWSER, P. R. Anesthetic options for fish. In: *Recent Advances in Veterinary and Analgesia: Companion animals*, GLEED, R. D.; LUDDERS, J. W (Eds.). **International Veterinary Information Service** ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Ithaca, Nova York, EUA, 2001.
- BRIOZZO, J. L.; CHIRIFE, J.; HERZAGE, L.; D'AQUINO, M. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. **J. Appl. Bacteriol.**, 66, p. 69-75, 1989.
- BROWN, L. A. Anesthesia and restraint. In: **Fish Medicine** (STOSKOPF, M. K. ed.), p. 79-90. Saunders, Philadelphia, 1993.
- BURKA, J. F.; HAMMEL, K. I.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARS, D. J. Drugs in salmonid aquaculture - a review. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 20, p. 333-349, 1997.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C.; MARTINS, M. L. Estresse devido ao transporte e à ação da benzocaína em parâmetros hematológicos e população de parasitas em matrinxã, *Brycon cephalus* (TELEOSTEI: CHARACIDAE). In: CARNEIRO, P. C. F. **Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, *Brycon***

- cephalus* (TELEOSTEI: CHARACIDAE). Jaboticabal, SP. 139 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), 2001.
- CASILLAS, E. & SMITH, L. S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish Biol.**, v.10, n.5, p. 481-491, 1977.
- CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal. FUNEP, 189p., 1992.
- CATTERALL, W.; MACKIE, K. Anestésicos locais. In: **Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Tenth Edition, A. Gilman, J. Hardman and L. Limbird, eds., McGraw-Hill Press, p. 279-292, 1996.
- CHO, G. K.; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Watbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 537-546, 2000.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Ass. J.**, v. 50, p. 550- 552, 1944.
- CONKLIN, D., CHAVAS, A., DUFF, D., WEAVER, L., ZHANG, Y., OLSON, K.R. Cardiovascular effects of arginine vasotocin in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 2821– 2832, 1997.
- COOKE, S. J.; SUSKI, C. D.; OSTRAND, K. G.; TUFTS, B. L.; WAHL, D. H. Behavioral and physiological assessment of low concentration of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*) **Aquaculture**, v. 239, p. 509-529, 2004.
- COVINO, B. G. Toxicity and systemic effects of local anesthetic agents . In: Local Anesthetics (STRICHARTZ, G. R., ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 81. Berlin, Springer-Verlag, p. 187-212, 1987.
- CROUX, M. J. P.; MONTAGNA, M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic for juveniles *Pimelodus clarias maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Iheringia**, v. 84, p. 29-32 (Série Zoológica), 1998.
- DABROWSKA, D., *et al.* Determination of the aluminum levels in selected medicinal plants. **Annales Academiae Medicae Gedanensis** , v.19, p. 155-164, 1989.

- DAVIDSON, G. W.; DAVIL, P. S.; YOUNG, G.; FOWLER, R. T. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUI-S. **J. World Aquac. Soc.**, v. 31, p. 105-114, 2000.
- DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. **Aquaculture**, v. 233, p. 531-548, 2004.
- DAWSON, V. K.; GILDERHUS, P. A. Ethyl-p-aminobenzoate (benzocaine): efficacy as an anesthetic for five species of freshwater fish. **U. S. Fish Wildl. Serv. Invest. Fish Contr.**, v. 87, p. 1-5, 1979.
- DOGGETT, T. A.; HARRIS, J. E. Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*. **J. Fish Biol.**, v. 33, p. 747-756, 1989.
- DONALDSON, E. M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: Academic Press, p. 11-47, 1981.
- ELLIS, A. E. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. **J. Fish Biol.**, v. 8, p. 143-156, 1976.
- ELLIS, A. E. The leucocytes of fish: A review. **J. Fish Biol.**, v. 11, p. 453-491, 1977.
- EL-SAYED ALI, T.; MONINO, A.; CERDA, M. J. Primeros ensayos de determinación del consumo de oxígeno de juveniles de tilápia (*Oreochromis niloticus*, L.) bajo diferentes condiciones de temperatura y frecuencia alimentaria. **CIVA 2003** (<http://civa.2003>), p. 885-880, 2003.
- ENDO, T.; OGIHIMA, K.; TANAKA, H.; OSHIMA, S. studies on the anesthetic effect of eugenol in some freshwater fishes. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, v. 38, p. 761-767, 1972.
- EZZAT, A.A. *et al.* Studies on the blood characteristics of *Tilapia zillii* (Gervais). I. Blood cells. **J. Fish Biol.**, n. 6, p. 1-12, 1974.
- FABRI, E.; CAPUZZO, A.; MOON, T. W. The role of circulation catecholamines in the regulation of fish metabolism: an overview. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 120, p. 177-192, 1998.
- FAÇANHA, M.F.; GOMES, L.C. . A eficácia do mentol como anestésico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.

- FARMALAB CHIESI INDÚSTRIA FARMACÊUTICA,  
<http://www.farmalabchiesi.com.br>. Acesso em 12 de março de 2006.
- FERGUSON, H. W. The ultrastructure of plaice (*Pleuronectes platessa*) leucocytes. **J. Fish Biol.**, v. 8, p. 139-412, 1976.
- FERNANDES, M.O. **Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes**. Botucatu, SP. 82p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, 1997.
- FERREIRA, J. T.; SCHOONBEE, H. J.; SMIT, G. L. The use of benzocaine - hydrochloride as an aid in the transport of fish. **Aquaculture**, v. 42, n. 2, p. 169-174, 1981.
- FRANCISCHINI, A. D.; CARAMASCHI, E. P. Anestesia e marcação em laboratório de algumas espécies de peixes de água doce. **XVI Congresso Brasileiro de Zoologia**, João Pessoa, PB, de 22 a 27 de janeiro, p. 52, 1989.
- FREDERICKS, K. T.; GINGERICH, W. H.; FATER, D. C. Comparative cardiovascular effects of four fishery anesthetics in spinally transected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 104, p. 477-483, 1993.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K. & PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo, Editora Varela. 1994.
- GILDERHUS, P. A.; MARKING, L. L. Comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. **North Am. J. Fish. Manage.**, v. 7, p. 288-292, 1987.
- GODFREY, M.A.L. Immunoaffinity extraction in veterinary residue analysis – a regulatory viewpoint. **The Analyst**, v.123, n.12, p.2501-2506, 1998.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROUSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 56, n. 1, p. 50-59, 1971
- GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **J. World Aquacult. Soc.**, v. 32, p. 426-431, 2001.

- GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. Avaliação dos efeitos do sal e da densidade no transporte de tabaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 283-290, 2003.
- GUNN, E. Floundering in the foibles of fish anaesthesia, publicação on line in: [http://www.animal.uq.edu/lecture/anim3002/fish\\_anaesthesia.pdf](http://www.animal.uq.edu/lecture/anim3002/fish_anaesthesia.pdf), 2000.
- HELLAND, S. J.; GRIDALE-HELLAND, B.; NERLAND, S. A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. **Aquaculture**, v. 139, p. 157-163, 1996.
- HIKASA, Y.; TAKASE, K.; OGASAWARA, T.; OGASAWARA, S. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v. 48, n. 2, p. 341-351, 1986.
- HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **Brit. J. Haematol.**, v. 92, p. 200-211, 1996.
- HILL, J. V.; DAVISON, W.; FORSTER, M. E. The effects of fish anaesthetics (MS222, metomidate and AQUI-S) on heart ventricles, the cardiac vagus and branchial vessels from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 27, p. 167-177, 2004.
- HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **B. Inst. Pesca**, v. 22, n. 1, p. 73-84, 1995.
- HINE, P. M.; WAIN, J. M. Observations on eosinophilic granule cells in peritoneal exudates of cells. *Anguilla australis*. **J. Fish Biol.**, v. 34, p. 841-853, 1989.
- HISANO, H.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; KLEEMANN, G. K.; FREIRE, E. S.; GONÇALVES, G. S.; ZUANON, J. A. S.; SÁ, M. V. C. Yeast and zinc on hematological parameters of Nile tilapia fingerlings *Oreochromis niloticus*. In: World Aquaculture, Salvador, BA, **Anais...**, p. 575, 2003.
- HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperature-zone fishes. **J. Fish Biol.**, v. 64, p. 1136-1142, 2004.

- HOUSTON, A. H.; DeWILDE, M. A. Thermoacclimatory variations in the haematology of the common carp, *Cyprinus carpio*. **J. Exp.Biol.**, v. 49, p. 71-81, 1968.
- HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N. KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to stimulated winter, spring and summer conditions. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 15, n. 4, p. 339-347, 1996.
- HOWE, G. E.; BILL, T. D.; MARKING, L. L. Removal of benzocaine from water by filtration with activated carbon. **Prog. Fish-Cult.**, v. 52, p. 32-35, 1990.
- HRUBE, T. C.; SMITH, S. Hematology of fish. In: **Schalm`s Veterinary Hematology**, 5<sup>a</sup> ed. p. 1120-1125, 1998.
- HUNN, J. B.; GREER, I. E. Influence of sampling on the blood chemistry of Atlantic salmon. **Prog. Fish-Cult.**, v. 53, p. 184-187, 1991.
- IMAGAWA, T.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, Y.; KUDO, N.; SUGIMURA, M. Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Jpn. J. Vet. Sci.**, v. 51, p. 1163-1172, 1989.
- INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- ISHIOKA, H. Effects of handling and anaesthetization with MS222 on the blood constituents of Red Sea Bream, *Pagrus major* (Temminck *et* Schlegel). **Bull. Nansei Reg. Fish**, n. 16, p. 53-61, 1984.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; McKINLEY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potencial stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.

- IWANA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN. **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, v. 3, cap. 1, p. 1-5, 1994.
- IWANA, G. K.; McGEER, J. C.; PAWLUK, M. The effect of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol and adrenaline in rainbow trout. **Can. J. Zool.**, v. 67, p. 2065-2073, 1989.
- JOBLING, M.; ARNESEN, A. M.; BAARDVIK, B. M.; CHRISTIANSEN, J. S.; JORGENSEN, E. H. Monitoring feeding behaviour and food intake: methods and applications. **Aquac. Nutr.**, v. 1, p. 131-143, 1995.
- JOBLING, M.; COVÈS, D.; DAMSGARD, B.; KRISTIANSEN, J. S.; KOSKELA, J.; PETURSDOTTIR, T. E.; KADRI, S.; GUDMUNDSON, O. Techniques for measuring feed intake. In: HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Eds.), **Food Intake in Fish**. Blackwell, Oxford, p.49-87, 2001.
- JOHANSSON-SJOBECK, M.; DAVE, G.; LARSSON, A.; LEWANDER, K.; LIDMAN, U. Hematological effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 60, p. 165-168, 1978.
- KALASHNIKOVA, Z. M. On the classification of morphological elements in the blood of fish. **J. Ichthyol.**, v. 3, n. 16, p. 459-472, 1976.
- KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.
- KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; HEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.
- KING, W.V.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S.; BENTON, C.; BERLINSKY, D. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquaculture Research**, p. 1-8, 2005.



- KÖHLER, M., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.
- LAIDLEY, C. W.; LEATHERLAND. Cohort sampling, anesthesia, and stocking density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite, and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v. 33, p. 73-88, 1988.
- LARSON, A.; JOHANSSON-SJOBECK, M. J.; FANGE, R. Comparative study of some hematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. **J. Fish Biol.**, v. 9, p. 425-440, 1976.
- LAY, P. A.; BALDWIN, J. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlation with oxygen transport and nuclear volume. **Fish Physiol. Bioch.**, v. 20, p. 31-35, 1999.
- LESTER, R. J. G.; DANIELS, B. A. The eosinophilic cell of the white sucker. *Catostomus commersoni*. **J. Fish Res. Board Can.**, v. 33, p. 139-144, 1976.
- LESTER, R. J. G.; DESSER, S. S. Ultrastructural observations on the granulocytic leucocytes of the teleoste. *Catostomus commersoni*. **Can. J. Zool.**, v. 53, p. 1648-1657, 1975.
- LOWE-JINDE, L.; NIIMI, A. J. Influence of sampling on the interpretation of hematological measurements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 396-402, 1983.
- LUSKOVA, V. Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. **Acta Sc. Nat. Brno**, v. 31, n. 5, p. 70, 1997.
- MAHAJAN, C. L.; DHEER, J. S. Cell types in the peripheral blood of an air-breathing fish *Channa punctatus*. **J. Fish Biol.**, v. 14, p. 481-487, 1979.
- MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries. **Fisheries**, v. 10, n. 6, p. 2-5, 1985.
- MATTSON, N. S.; RIPPLE, T. H. Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. **Aquaculture**, v. 83, p. 89-94, 1989.

- MAVAREZ, R. N.; PÉREZ, T. E. Blood adaptation to marine and freshwater environments in fish of the family Sciaenidae (Perciformes). **J. Fish. Biol.**, v. 25, p. 657-666, 1984.
- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: Academic Press, p. 49-76, 1981.
- McARTHUR, J. I.; THOMSON, A. W.; FLETCHER, T. C. Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. **J. Fish Biol.**, v. 27, n. 5, p. 667-676, 1985.
- McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p. 119-144, 1997.
- McFARLAND, W. N. The use of anesthetics for the handling and the transport of fishes. **Calif. Fish Game**, Sacramento, v. 46, p. 407-431, 1960.
- McLEAY, D.J. Sensitivity of blood cell counts in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to stressors including sublethal concentrations of pulpmill effluent and zinc. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, v. 32, p. 2357-2364, 1975.
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999.
- MORGAN, J. D.; IWANA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In: IWANA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p. 247-270, 1997.
- MORROW, W. J. W.; PULSFORD, A. Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. **J. Fish Biol.**, Huntingdon, v. 17, n. 4, p. 461-475, 1980.
- MUIR, W. W.; HUBBELL, J. A. E.; SKARDA, R. T.; BEDNARSKI, R. M. **Handbook of veterinary anesthesia**. 2ª edição. Missouri, EUA, 510p, 1995.

- 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.**, v. 51, p. 931-938, 1997.
- MURARI, R.; ALMEIDA, S. A.; SATAKE, T.; OGARAWARA, T. M.; LOPES, R. A. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XXVIII. Parâmetros da série vermelha do cascudo *Hypostomus acistroides* Thering, 1911 (Pisces, Loricariidae). **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 713-714, 1992.
- MYLONAS, C. C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.
- NAKAMOTO, W., SILVA, A. J., MACHADO, P. E. A. & PADOVANI, C. R., 1991, Glóbulos brancos e *Cyrtosporidium gomesi* (hemoparasita) em *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Pisces; Synbranchidae) da região de Birigüi, SP. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 51, n. 4, p. 755-761, 1991.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. *Clove oil*. Disponível na Internet: <http://ntp-server.niehs.nih.gov>. Acesso em 23 de maio de 2002.
- NIKINMAA, M.; SOIVIO, A.; NAKARI, T.; LINDGREN, S. Hauling stress in brown trout (*Salmo trutta*): physiological responses to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackish water. **Aquaculture**, v. 34, p. 93-99, 1983.
- OLSEN, Y. A.; EINARSDOTTIR, I. E.; NILSSEN, K. J. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. **Aquaculture**, v. 134, p. 155-168, 1995.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. Situação atual da Aquicultura brasileira e mundial. p. 354 – 381. In: VALENTI, C.V.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.B. **Aquicultura no Brasil bases para um Desenvolvimento Sustentável**. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia. 399 p., 2000.
- PEAKE, S. Sodium bicarbonate and clove oil as potential anesthetics for nonsalmonid fishes. **North Am. J. Fish. Manage.**, v. 18, p. 919-924, 1998.

- PETERSON, M. S. Hypoxia-induced physiological changes in two mangrove swamp fishes: sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus lacepede* and sailfin molly, *Poecilia latipinna* (Lesueur). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 97, p. 17-21, 1990.
- PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.224, p. 1-8, 2002.
- PITOMBEIRA, M.S.; MARTINS, J. M. Haematology of the Spanish mackerel, *Scomberomorus maculatus*. **Copeia**, n. 1, p. 182-186, 1970.
- PRINCE, A.; POWELL, C. Clove oil as an anaesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. **North Am. J. Fish. Manage.**, v. 20, p. 1029-1032, 2000.
- RAMBHASKAR, B.; SRINIVASA-RAO, K. Comparative haematological of ten species of marine fish from Visakhapatnam coast. **J. Fish Biol.**, v. 30, p. 59-66, 1987.
- RANDALL, D. J. Effect of an anaesthetic on the heart and respiration of teleost fish. *Nature*, v. 195, 1962.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia de peixes. In: SANTOS, H. S. L. (Ed.). **Histologia de Peixes**. São Paulo. FCAV-UNESP, 83 p., 1991.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Células sanguíneas e contagem diferencial dos leucócitos de tainha, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia, SP (Lat. 25°00'S – Long. 47°55'W). **B. Inst. Pesca**, v. 22, n. 1, p. 23-40, 1995.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., TABATA, Y. A. & EIRAS, A. C. Hematologia comparada entre diplóides e triplóides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces, Salmonidae). **Revta. Bras. Zool.**, v. 5, n. 4, p. 1093-1102, 1998.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C.; EIRAS, A. C.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, SP. **B. Inst. Pesca**, v. 25, p. 77-83, 1998/1999.

- RANZANI-PAIVA, M.J. *et al.* Haematological characteristics and relative conditions factor (Kn) associated with parasitism in *Schizodon borellii* (Osteichthyes Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes Prochilodontidae) from Paraná River, Porto Rico region, Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, n. 22, v. 2, p. 515-521, 2000.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L.; VEIGA, M. L.; EIRAS, A. C.; CAMPOS, B. E. S. Differential leucokocyte counts in "dourado", *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP. **Braz. J. Biol.**, v. 63 n.3, 2003.
- RANZANI-PAIVA, M. J. P.; SILVA-SOUZA, A. T. Co-infestation of gills by different parasite groups in the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae): effects on relative condition factor. **Braz J. Biol.**, v. 64, p. 677-682, 2004.
- RIBEIRO, W. R. **Contribuição ao estudo de hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoiéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacèpède, 1803.** Ribeirão Preto, Tese, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 140 p., 1978.
- ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces.** Madrid: Mundi –Prensa, 366 p., 1981.
- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. **Prog. Fish-Cult.**, v. 49, n. 1, p. 1-12, 1987.
- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R. Plasma cortisol and the secondary responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. **Aquaculture**, v. 68, p. 115-130, 1988.
- RODRIGUES, E. L.; MISSIMA, F.; AZEVEDO, T. D. Análises hematológicas do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), mantidas em pesque-pague ao longo das estações do ano. In: Encontro Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos, 7 e Encontro Latino-Americano de Patológicas de Organismos Aquáticos, 3. Foz de Iguaçu, PR, **Anais...**, p. 41, 2002.

- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantã**, v. 20, p. 315-328, 1947.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**, 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell, London, UK. 159 p., 1999.
- ROTHWELL, S. E.; BLACK, S. E.; JERRETT, A. R.; FORSTER, M. E. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). **Com. Biochem. Physiol. A**, v. 140, p. 289-298, 2005.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; LOURENÇO, J. N. P.; FONSECA, F. A. L.; SANTOS, P.J. O.; VAL, A. L. Efficacy of eugenol as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. International Congress on biology of fishes. **Tropical fish: news and news**, p. 93-96, 2001.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Effects of hypoxia on the venous circulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 140, p. 233–239, 2005.
- SCHRECK, C. B. Immunomodulation: Engogenous factors. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. (Eds.). **The fish immune system – organism, pathogen and environment**, p. 311-337, 1996.
- SLADKY, K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.
- 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**, v. 218, p.177-185, 2003.
- SMITH, L. S. **Introduction of fish physiology**. Los Angeles: T. H. F., 353 p., 1982.

- SOIVIO, A.; NIKINMAA, M. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: Academic Press, p. 197-221, 1981.
- SORUM, U.; DAMSGARD, B. Effects of anaesthetisation and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 232, p. 333-341, 2004.
- SOTO, C.; BURHANUDDIN. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, p. 149-152, 1995.
- STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Evaluation of AQUIS (efficacy and minimum toxic concentration) as a anaesthetic/sedative for public aquaculture in United States. **Aquac. Res.**, v. 30, p. 345-349, 1999.
- STONE, D.; TOSTIN, N. Clove bud oil a big yawn for silver perch. **Fish. NSW Mag. Spring**, v. 19, 1999.
- STRANGE, R. J.; SCHRECK, C. B. Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **J. Fish. Res. Board. Can.**, v. 35, p. 345-349, 1978.
- SUN, L. T.; CHEN, G. R.; CHANG, C. F. The physiological responses of tilapia to low temperatures. **J. Thermal. Biol.**, v. 17, n. 3, p. 149-153, 1994.
- 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, MD, pp. 213-272, 1990.
- SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of the peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp. *Cyprinus carpio*. **J. Fish Biol.**, v. 29, p. 349-364, 1986.
- SYLVESTER, J. R. Factors influencing the efficacy of MS-222 to striped mullet (*Mugil cephalus*). **Aquaculture**, v. 6, p. 163-169, 1975.
- TAVARES-DIAS, M. **Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica**. Jaboticabal, SP. 248 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura), 2003.

- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars. Veterinária**, Jaboticabal, v. 14, p. 254-263, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturadas em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, **Brasi. Biosci. J.**, v. 19, n. 1, p. 107-114, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R., **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: M., TAVARES-DIAS, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIN, E. F. S. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomus*. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 2, p. 151-155, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. **R. Bras. Zool.**, v. 16, p. 423-431, 1999.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; NOVATO, P.F.C.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolopis hornorum* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: Proceeding of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Tilapia Aquaculture, R.J., 3 a 7/12. **Anais...**, p. 533-541, 2000.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L.; SANTANA, A. E. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **B. Inst. Pesca**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2002.
- THOMAS, P. L. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulphate and metomidate. **Aquaculture**, v. 96, p. 69-86, 1991.
- TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. Cortisol e haematological response in sea bream and trout subjected to anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.



- TYE, J.; PAGE, G. Spicing-up fish anaesthesiology. **Aquatalk** – Aquaculture news at the University of Guelph, v. 3, n. 1, p. 1-3, 1998.
- TYTLER, P.; HAWKINS, A. D. Vivisection, anaesthetics and minor surgery. In: HAWKINS, A. D. (Editor). **Aquarium Systems**. Academic Press, New York, NY, p. 247-278, 1981.
- UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.
- UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Part II. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 38, n. 6, 2001.
- VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. **Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects**. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 224 p., 1995.
- VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; AFFONSO, E. G. Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobin, hematology, intraerythrocytic of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 97, n. 3, p. 435-440, 1990.
- VEIGA, M. L.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). **Revista Chilena de Anatomia**, v. 18, n. 2, 2000.
- VELOZO, E. **Histoquímica do cravo**. Universidade Federal da Bahia. Homepage. Disponível na Internet: <http://www.ufba.br/~euvelozo/monograf.htm>. Acesso em 22 de março de 2002.
- VOLKOV, I. V. On the physiology of the leukocyte system of *Vimbia vimbia* from Neman river. **J. Ichthyol.**, v. 18, n. 1, p. 148-153, 1978.

- WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.
- WAGNER, G. N.; SINGER, T. D.; MCKINLEY, R. S. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1139-1146, 2003.
- WATERSTRAT, P. Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. **J. World Aquacult. Soc.**, v. 30, p. 250-255, 1999.
- WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with M.S-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish. Res. Bd. Canada**, v. 27, p. 909-914, 1970.
- WELLS, R. M. G.; ASHBY, M. D.; DUNCAN, S. J.; McDONALD, J. A. Comparative study of the eritrocytes and haemoglobins in nototheniid fishes from Antarctica. **J. Fish Biol.**, v. 17, p. 517-527, 1980.
- WENDELAAR BONGA, B. S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625, 1997.
- WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adultsockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, 2002, acesso em 23 maio de 2006, [www.idealibrary.com](http://www.idealibrary.com).
- WURTS, W. A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v. 26, p. 80-81, 1995.
- YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C.; OKAMOTO, N. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 599-603, 2001.
- YANAR, M.; KUMLU, M. The anaesthetics effects of quinaldine sulphate and/or diazepam on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Turk J. Vet. Anim. Sci.**, v. 25, p.185-189, 2001.

YOKOYAMA, H. O. Studies on the origin, development, and seasonal variations in the blood cells of the perch, *Perca flavescens*. **Wildlife Diseases**, v. 6, p. 1-102, 1960.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 3<sup>rd</sup>. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 662 p., 1996.