

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

EFEITOS DO ÓLEO DE CRAVO NO COMPORTAMENTO DA
TILÁPIA DO NILO

Dneson Ricardo da silva

Jaboticabal, São Paulo

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

EFEITOS DO ÓLEO DE CRAVO NO COMPORTAMENTO DA
TILÁPIA DO NILO

Dneson Ricardo da silva

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto

Apresentado ao Programa de Pós-
graduação em Aquicultura do Centro
de Aquicultura da UNESP –
CAUNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2020

Silva, Dneson Ricardo
S586e Efeitos do óleo de cravo no comportamento da Tilápia do Nilo / Dneson
Ricardo da Silva. -- Jaboticabal, 2020
vi, 26 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2020
Orientador: Rodrigo Egydio Barreto
Banca examinadora: Percília Cardoso Giaquinto, Helton Carlos Delicio
Bibliografia

1. Óleos essenciais. 2. Bem-estar. 3. Comportamento alimentar. I. Título.
II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

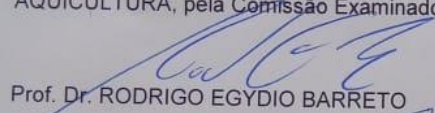
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Efeito do Óleo de Cravo no Comportamento da Tilápia do Nilo

AUTOR: DNESON RICARDO DA SILVA

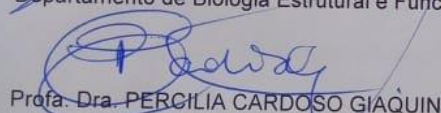
ORIENTADOR: RODRIGO EGYDIO BARRETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em
AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



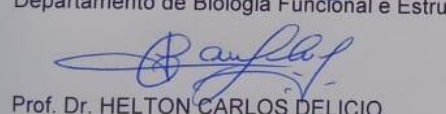
Prof. Dr. RODRIGO EGYDIO BARRETO

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Profa. Dra. PERCÍLIA CARDOSO GIAQUINTO

Departamento de Biologia Funcional e Estrutural / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof. Dr. HELTON CARLOS DELÍCIO

Departamento de Fisiologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Jaboticabal, 05 de junho de 2020.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e a mãe rainha Nossa Senhora Aparecida onde busco constantemente diante da minha fé forças tanto nos momentos de aflição e alegria, a minha mãe Maria Lúcia que mesmo sem estudo me ensinou a maior lição da vida o significado do respeito ao próximo, aos meus avos Benedito da Silva (*In memorian*) e Maria Cicera onde me guarda a cada noite por vil mental mesmo distante, as minhas irmãs, tios e primos onde foram, e são, muito importantes na minha formação pessoal.

Ao Rodrigo, meu orientador, por todo ensinamento passado, paciência e apoio, mesmo sabendo das minhas dificuldades e mudanças ocorridas conseguiu enxergar minhas aflições durante a pós, sendo um exemplo de orientador e pessoa a seguir, tenho muita gratidão.

Aos professores Percília e Helton que fizeram parte da banca de qualificação e defesa, aconselhando e incentivando como conduzir esse caminho árduo e bonito que é a pesquisa, sempre com toda paciência e compreensão entendendo minhas dificuldades, obrigado.

Aos amigos do departamento de comportamento, Alexandre, Bruno, Isa, João, Vanessa e Renata técnica do departamento, auxiliando sempre que necessário.

Aos meus amigos da pós - caunesp, Aline, Andressa, Daiane, Joseane, Manuel, Monique, keyla e Ricacio, da cidade de Registro, Marco (nino).

Ao meu antigo orientador de graduação e amigo Daniel por acreditar no meu potencial de vida acadêmica, aconselhando e norteando no caminho da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Sumário

RESUMO	2
1. Introdução	4
2. Materiais & Métodos	7
2.a. Animais e condição de estoque.....	7
2.b. Anestésico	7
2.c. Delineamento experimental e procedimentos	8
2.d. Nota ética	10
2.e. Análise dos dados.....	11
3. Resultados	11
3.a. Anestesia	11
3.b. Comportamento alimentar	12
3.c. Comportamento agressivo	15
4. Discussão	19
Referências bibliográficas	23

RESUMO

Óleos essenciais com efeitos sedativos vêm sendo usados como potenciais substitutos de anestésicos sintéticos. Nessa linha, o óleo extraído de partes da planta do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*) vem ganhando notoriedade como anestésico. Esse óleo vem sendo considerado eficaz, pois induz anestesia rapidamente, e também seguro, pois a recuperação dos reflexos é breve e ocorre baixa mortalidade. Entretanto, não se sabe se há modificações na reatividade a estímulos relevantes e nem se afeta os componentes motivacionais do comportamento. Como os efeitos dos anestésicos se dão no sistema nervoso, é plausível supor tais possibilidades. Neste estudo, utilizando a tilápia-do-Nilo (linhagem Supreme, revertidas sexualmente), um peixe altamente relevante para aquicultura mundial, testamos essa hipótese mencionada anteriormente. Operacionalmente, mensuramos elementos dos comportamentos alimentar e agressivo como meio para inferirmos efeitos na reatividade a estímulos e na motivação. Para isso, utilizando a técnica da exposição em banho, submetemos os peixes a 3 condições diferentes (n = 12 cada): 1) controle negativo (sem anestésico) e duas soluções alcoólica de óleo de cravo diluído em água 2) 50mg/L e 3) 100 mg/L. As tilápias foram selecionadas aleatoriamente, removidas do tanque de estoque e inseridas isoladas em banho de solução anestésica em baldes plásticos atóxicos até atingirem o estágio II de anestesia (perda de equilíbrio e reflexo, pouco ou nenhum movimento muscular, mas manutenção das batidas operculares). Quantificamos o tempo para atingir esse estágio e, assim que atingido, os peixes foram removidos do banho e introduzidos em aquários (1 peixe por aquário) para futuras observações do comportamento. Os peixes controle (0 mg/L) foram expostos aos mesmos procedimentos e permaneceram nos baldes até o maior intervalo de tempo para um dos peixes da bateria atingir o estágio II de anestesia. As tilápias foram mantidas nos aquários por 4 dias consecutivos e, enquanto o comportamento alimentar foi avaliado diariamente, o agressivo foi avaliado no segundo e no quarto dia. Nossas evidências indicam que o óleo de cravo não afetou os componentes consumatórios e apetitivos dos comportamentos avaliados. Assim, nossos resultados reforçam o uso seguro de óleo de cravo-da-índia em práticas de aquicultura que requerem anestesia em tilápias.

Palavra-chave: Óleo de cravo; Agressão; Comportamento alimentar; Peixe; Óleo essencial; Anestesia.

ABSTRACT

Essential oils with sedative effects have been used as potential substitutes for synthetic anesthetics in aquaculture. In this context, the oil extracted from parts of the clove plant (*Eugenia caryophyllata*) has been gaining notoriety as anesthetic. This oil has been considered effective, because it induces anesthesia quickly, reflex recovery is brief and has low mortality rate. However, it is unknown whether there are changes in stimuli reactivity and behavioral motivational in fish after anesthesia recovery. As the effects of anesthetics are on the central nervous system, it is plausible to assume such possibilities. In this study, using Nile tilapia (Supreme lineage, sexually reversed), a highly relevant fish for world aquaculture, we tested this hypothesis. Operationally, we measured elements of feeding and aggressive behaviors to infer effects on reactivity to stimuli and motivation. For this, using the bath exposure technique, we submitted the fish to 3 different conditions (n = 12 each): 1) negative control (without anesthetic) and two alcoholic solutions of clove oil diluted in water 2) 50 mg / L and 3) 100 mg / L. Tilapia were randomly selected, captured from the stock tank and placed isolated in bath of anesthetic solution until they reach stage II of anesthesia (loss of balance and reflex, few or no muscle movement, but maintenance of opercular beats). We quantified the time to reach this stage and, once reached, the fish were removed from the bath and introduced into test aquaria for behavior observation. Control fish were exposed to the same procedures and remained into the solution until the longest period for one of the fish in the batch to reach stage II of anesthesia. Tilapia were kept in the aquaria for 4 consecutive days. We evaluated feeding behavior daily and aggressive behavior on the second and fourth days. Our evidences show that clove oil did not affect reactivity to stimuli and motivation regarding these evaluated behaviors. Thus, our results reinforce the safe use of clove oil in aquaculture practices that require anesthesia in fish.

Keywords: Clove oil, Aggression, Feeding behavior, Fish, Essential oil, Anesthesia.

1. Introdução

O assunto do bem-estar animal está cada vez mais presente nas discussões sobre produção animal e experimentação com o uso de modelos animais (Gonyou, 1994). Nessa linha, os peixes não são exceções e podem ter alterações no estado de bem-estar como resultado de atividades humanas, como a aquicultura e seus procedimentos (Huntingford et al., 2006). Em relação aos peixes, embora seja incerta a sua capacidade subjetiva de experimentar sofrimento, temos uma série de evidências que sustentam a necessidade de uma abordagem preventiva de sofrimento por questões éticas (Chandroot et al., 2004; Conte, 2004; Volpato et al., 2007; Volpato, 2009). Nesse sentido, peixes reconhecem por meio de múltiplas pistas sensoriais estímulos potencialmente prejudiciais, como predadores, e deflagram respostas de defesa/estresse (Barreto et al., 2003; Franchina e Stoddard, 1998; Giaquinto e Volpato, 2001; Ide et al., 2003; Barreto et al., 2010; Barbosa Júnior et al., 2010). Tais estímulos (predadores) e outros, como ambientes novos expostos, podem gerar reações típicas de medo e reações similares à ansiedade (Blanchard e Blanchard, 1986). Além disso, os peixes possuem os aparatos estruturais-funcionais para nocicepção e percepção da dor (Kats e Dill, 1998).

Uma série de atividades relativas à aquicultura impõe uma variedade de estressores agudos aos peixes, podendo impactar negativamente uma série de processos, como o crescimento e a sobrevivência (Barton, 2002). Uma medida para minimizar os efeitos de estímulos estressores/dolorosos nos peixes é a utilização de anestésicos (Summerfelt e Smith, 1990; Stoskopf, 1993).

Tais práticas que incluem o uso de anestésicos na aquicultura a fim de minimizar possíveis problemas são, por exemplo, durante a desova artificial, pesagens, marcações,

classificações, amostragens de sangue, procedimentos cirúrgicos (Anderson et al., 1997) e transporte (Cooke et al., 2004). A anestesia pode ser leve, causando um efeito calmante, ou mais severa, levando a sedação e abolição da dor em peixes. Para tal, uma série de drogas anestésicas vem sendo utilizadas em peixes, como a benzocaína (etilpara-aminobenzoato), MS222 (tricaína, metano-sulfonato), o 2-fenoxietanol, a quinaldina (2-4-metilquinolina) (Sedgwick,1986).

Anestésicos alternativos aos exemplos de drogas sintéticas mencionadas anteriormente vêm sendo buscados para se aplicar na produção animal. Entre essas substâncias podemos mencionar os óleos essenciais de plantas (Javahery et al., 2012; Bowker et al., 2015; Hoseini et al.,2019).Entre esses óleos destaca-se o de cravo, que é um óleo essencial extraído de partes da planta *Eugenia caryophyllata* (Javahery et al., 2012; Hoseini et al., 2019). Esse óleo tem um antigo histórico como anestésico de uso local em humanos (Woody et al. 2002) e foi reconhecido como anestésico para peixes a algumas décadas atrás (Emdo et al., 1972; Soto e Burhanuddin, 1995; Javahery et al., 2012). Os principais componentes do óleo de cravo que agem como anestésico são o eugenol e o isoeugenol (Javahery et al., 2012). Essas substâncias são consideradas seguras para humanos, tendo classificação como GRAS (Generally Recognized As Safe) pela principal agência mundial reguladora de substâncias químicas o FDA - Food and Drug Administration dos EUA. Além da potencial segurança do óleo de cravo em termos de toxicidade, outra vantagem é que se trata de uma substância cujos processos de obtenção são baratos (Keene et al., 1998; Griffiths, 2000; Ross e Ross, 2008).

O óleo de cravo vem sendo usado com bom sucesso para uma série de espécies de peixes em baixa concentração e sem induzir mortalidade significativa (Soto e Burhanuddin, 1995; Munday e Wilson, 1997; Sladry et al., 2001; Woody et al., 2002). Além disso, tem tido bom efeito calmante durante o transporte de peixes, evitando

consequências pós-transporte (Cooke et al., 2004; Inoue et al., 2005; Simões et al., 2011). Contudo, muitas das informações sobre os efeitos do óleo de cravo em processos biológicos provêm de relatos anedóticos e existem poucas evidências sobre seus efeitos em variáveis fisiológicas, comportamentais e patológicas, como constatado por Javahery et al. (2012) ao revisarem o uso do óleo de cravo como anestésico em peixes.

As avaliações dos efeitos do óleo de cravo no comportamento de peixes se restringem especificamente à descrever os estágios que envolvem o processo de sedação (Cooke et al., 2004; Simões et al., 2010) e não há avaliações sobre as consequências dessa droga no comportamento após a recuperação do estado de sedação. O óleo de cravo impõe um efeito no sistema nervoso central (Summerfelt e Smith, 1990). Em relação a sua farmacocinética, embora sem evidências para a tilápia, sua meia vida é de aproximadamente 12h em trutas arco-íris (Guénette et al., 2007) e há evidências de detecção de níveis residuais deste anestésico em prazo maior em peixes marinhos e de água doce (Ke et al., 2018). Assim, é plausível propor que pode ocorrer efeitos pós-recuperação da sedação em relação à reatividade a estímulos relevantes e na motivação comportamental. Dessa forma, utilizando a tilápia-do-Nilo, um dos principais peixes da aquicultura mundial, avaliamos o efeito do óleo de cravo na reatividade a estímulos e na motivação comportamental. Operacionalmente, quantificamos se esses componentes consumatórios e apetitivos do comportamento alimentar e agressivo da tilápia-do-Nilo são afetados pela sedação com óleo de cravo.

2. Materiais & Métodos

2.a. Animais e condição de estoque

Exemplares juvenis (~1 mês de idade) de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* L., da linhagem Supreme, sexualmente revertidos (todos machos) foram obtidos em piscicultura e utilizados para constituirmos nossa população de estoque. Para tal, os animais foram alocados em um taque de alvenaria de 1200 L (300 indivíduos) com aeração constante, fluxo contínuo de água desclorificada para renovação ininterrupta de água e filtragem mecânica-biológica. Um termostato foi acrescentado ao tanque para manter a temperatura da água no intervalo de 24-26 °C. O foto período estabelecido foi de 12h de claro e 12 h de escuro, das 6 h às 18 h, com transição abrupta do claro para escuro, controlado por temporizador eletrônico. A iluminação foi artificial do tipo luz do dia (temperatura de ~5200 K), com intensidade luminosa de aproximadamente 120 lux na superfície d'água do tanque. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial peletizada (32% de proteína) até a saciedade. As tilápias ficaram nessas condições de estoque por um mês antes da experimentação.

2.b. Anestésico

Óleo essencial de cravo puro foi obtido da WNF - World's Natural Fragrances. Uma solução mãe foi produzida diluindo-se 1,5 g de óleo de cravo em 15 mL de etanol absoluto, perfazendo uma solução alcoólica de concentração de 100 mg/ml, a título de permitir a dissolução deste óleo essencial em água.

2.c. Delineamento experimental e procedimentos

Indivíduos da população de estoque foram capturados e aleatoriamente inseridos em baldes de plástico atóxico (1 peixe/balde) para serem expostos a banho de anestésico. Utilizamos 2 concentrações diferentes de banho de anestésico 50 ou 100 mg/L d'água, além de grupo sem anestésico (0 mg/L) para controlar os procedimentos para anestesia, totalizando 3 condições experimentais. Os animais ficaram em banho (a $26,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,51$; média \pm DP) até que atingissem o estágio II de anestesia. O estágio II de anestesia consiste na condição de perda do equilíbrio e do reflexo, poucos ou nenhum movimento muscular, mas manutenção dos batimentos operculares (Gilderhus e Marking, 1987; Stoskopf, 1993), descrição também obtida previamente para tilápia-do-Nilo Gontijo et al., (2003). O tempo para atingir o estágio II de anestesia foi quantificado e, assim que atingido, os animais foram transferidos para aquários de vidro com água desclorificada (40 x 23 x 25 cm, 20 L de água) e aeração constante, provida por compressores de ar anexados a pedras porosas via mangueiras de silicone atóxico. Os peixes controle (0 mg/L) foram expostos aos mesmos procedimentos e permaneceram nos baldes até o maior intervalo para um dos peixes do lote atingir o estágio II de anestesia (podendo ser tanto exposto a 50 ou a 100 mg/L), permitindo o controle dos procedimentos de anestesia. Os animais foram mantidos nesses aquários experimentais por 4 dias consecutivos para avaliação do comportamento alimentar e agressivo. O comportamento alimentar foi avaliado todos os dias deste período às 12:00 h, enquanto o comportamento agressivo foi avaliado no segundo e no quarto dia, utilizando-se o paradigma experimental do teste do espelho. Nosso tamanho amostral foi de $n = 12$ por condição experimental. Para atingir esse total, o experimento foi realizado em 4 baterias de $n = 3$ por condição, seguindo este protocolo descrito anteriormente. Os animais utilizados apresentaram massa média de 9,4 g e comprimento médio de 6,5 cm.

O comportamento alimentar foi definido operacionalmente como 1) o número de dias em que os animais ingeriram alimento, 2) a latência alimentar e 3) a ingestão alimentar. Esses elementos permitem inferir tanto a reatividade à presença do estímulo (alimento), quanto a motivação para se alimentar (Volpato et al., 2013). A latência alimentar foi definida como o tempo decorrido desde a introdução dos pellets nos aquários (os grânulos eram flutuantes e, assim, permaneciam na superfície) até o primeiro pellet ser abocanhado. A ingestão alimentar foi determinada para cada dia de alimentação calculando-se a diferença entre a quantidade de pellets oferecida e a quantidade remanescente após 15 min. Em cada alimentação foi fornecido 15 pellets por indivíduo (totalizando ~ 400 mg) por dia, o que equivale a cerca de 4,3 % da biomassa corporal média dos peixes. O consumo de ração foi medido em termos do número total de pellets (pellets ~3 mm) ingeridos e a massa ingerida foi inferida a partir desse valor.

O comportamento agressivo foi avaliado a partir de filmagens considerado operacionalmente como: 1) a latência para atacar o espelho e 2) o número de ataques desferidos no espelho. O teste do espelho foi realizado no segundo e no quarto dia do período experimental iniciando as filmagens sempre as 14:00 horas. Durante cada sessão, o espelho foi introduzido em uma das laterais menores do aquário experimental e o comportamento de cada peixe foi filmado durante um intervalo total de 10 min, dividido em 2 momentos diferentes, como segue: 5 min antes (0-5 min) e após (5-10 min) a queda de uma esfera de vidro na água. Após 5 min da introdução do espelho no aquário, uma esfera de vidro era abruptamente introduzida no aquário por meio de um tubo de PVC. O tubo foi posicionado a cerca de 70 cm do aquário, com inclinação suficiente para a esfera deslizar rapidamente para dentro do aquário. Após a queda da esfera, os animais eram filmados por mais 5 min. O tempo de queda da esfera, da soltura até atingir o fundo do aquário, foi de aproximadamente 2 s. A queda da esfera

foi realizada para promover resposta de sobressalto nos animais. A latência para retornar a atacar o espelho é inferido como o grau de motivação agressiva ou, em outras palavras, a duração do sobressalto fornece uma medida inversa de motivação para retomar a atividade anterior (baseado em Arnott e Elwood, 2009).

Em relação ao teste do espelho, no momento 1 (0-5 min), a latência de ataque é o tempo decorrido entre a introdução do espelho e o primeiro ataque deflagrado no mesmo. Por outro lado, no momento 2 (5-10 min), a latência de ataque é o tempo decorrido entre a queda da bola e o primeiro ataque subsequente ao espelho. Se algum peixe não atacasse o espelho em um ou ambos os momentos, o valor máximo de duração de cada momento (300 s) foi atribuído como o valor da latência de ataque. Os ataques ao espelho foram classificados em 2 tipos para quantificação: toques ou mordidas. Os toques consistem no ato do peixe se aproximar do espelho e o encostar com a boca fechada. As mordidas consistem no ato do peixe se aproximar do espelho com a boca aberta, justapô-la à superfície do espelho e executar rápidos movimentos caudais ondulatórios, impulsionando o corpo em direção ao espelho.

2.d.Nota ética

Essa tese foi realizada sob os princípios éticos em pesquisa animal, seguindo o protocolo para experimentos com uso de animais. A mesma tese foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus de Botucatu, protocolo número 1228.

2.e. Análise dos dados

Os valores do tempo de anestesia foram considerados não normais e heteroscedásticos. Assim, teste U de Mann-Whitney foi aplicado. Em relação ao comportamento alimentar e agressivo, os dados foram normais e homoscedásticos, assim estatística paramétrica foi aplicada. Para o número de dias que os peixes se alimentaram, utilizamos ANOVA de uma via. Para as demais variáveis, que incluem o fator tempo, com dependência amostral entre as medidas dentro de uma mesma condição, ANOVA mista foi aplicada, tendo como fator categórico a concentração de óleo de cravo e como medida repetida o tempo (dias, no caso do comportamento alimentar ou momentos, no caso do comportamento agressivo). Se necessário a ANOVA foi complementada por teste de Newman-Keuls. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

3.a. Anestesia

Inicialmente constatamos que o estágio II de anestesia foi atingido em intervalos de tempo diferentes associados à dose de anestésico. O tempo para atingir esse estágio de anestesia foi menor nos peixes exposto ao banho com 100 mg/L de óleo de cravo do que aqueles expostos a 50 mg/L (Teste U de Mann-Whitney; $Z = 3,78$; $P = 0,00016$; Fig. 1).

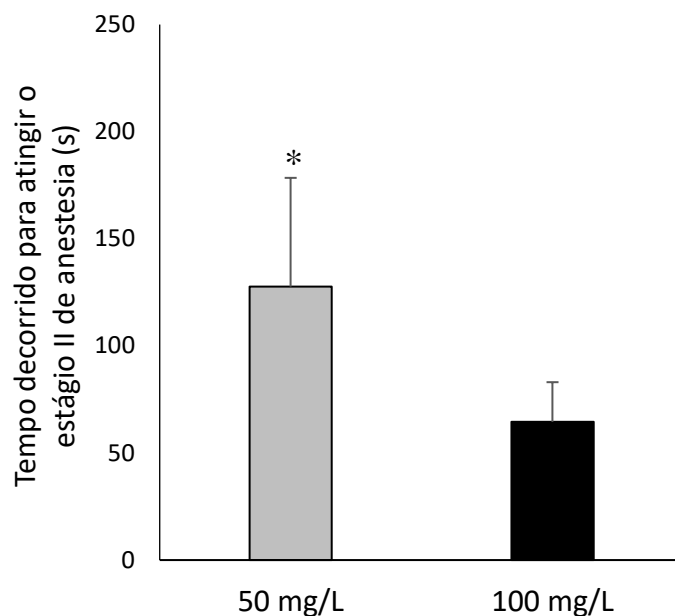


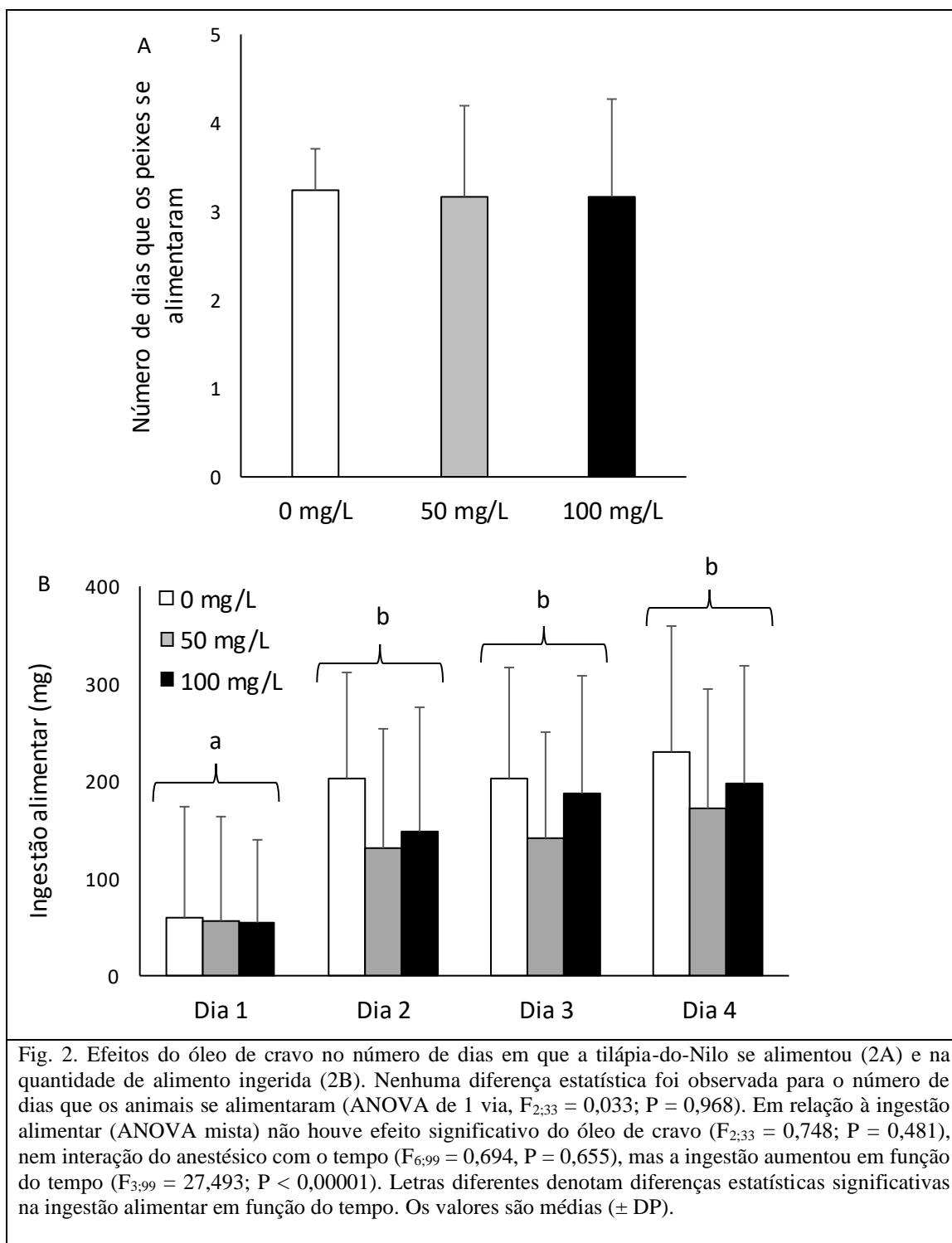
Fig. 1. Tempo para atingir o estágio II de anestesia em tilápias-do-Nilo expostas em banho a diferentes concentrações de soluções de óleo de cravo. O estágio II de anestesia para peixes é definido tipicamente como perda do equilíbrio e do reflexo, poucos ou nenhum movimento muscular, mas manutenção dos batimentos operculares (Gilderhus e Marking, 1987; Stoskopf, 1993). * indica diferença estatística entre os valores médios (\pm DP) dos grupos (Teste U de Mann-Whitney; $Z = 3,78$; $P = 0,00016$).

3.b. Comportamento alimentar

A ingestão alimentar foi avaliada ao longo dos 4 dias de experimentação. O número de dias em que cada peixe se alimentou não foi alterado pela anestesia (ANOVA de 1 via; $F_{2,33} = 0,033$; $P = 0,968$; Fig. 2A). Contudo, a ANOVA mista revelou que a ingestão aumentou a partir do segundo dia em relação ao primeiro dia (Fig. 2B), mantendo-se no mesmo patamar ao longo dos demais dias ($F_{3,99} = 27,493$; $P < 0,00001$), mas sem efeitos da anestesia ($F_{2,33} = 0,748$; $P = 0,481$) ou interação entre ela e o tempo (interação, $F_{6,99} = 0,694$, $P = 0,655$). Considerando a proximidade entre o primeiro dia de observação do comportamento alimentar e os procedimentos executados para anestesia, é plausível supor a hipótese de que este momento no tempo seja mais crítico. Assim, realizamos uma análise da ingestão alimentar considerando os valores

entre as condições apenas para o primeiro dia. Em tanto, a anestesia também não afetou a ingestão alimentar neste dia (ANOVA de 1 via; $F_{2,33} = 0,006$; $P = 0,994$; Fig. 2B).

A ANOVA mista revelou que a motivação para abocanhar o alimento (Fig. 3), expresso operacionalmente como a latência alimentar, não foi afetado pela anestesia ($F_{2,33} = 0,037$; $P = 0,964$), nem os efeitos do anestésico interagiram com os tempo ($F_{6,99} = 0,433$; $P = 0,856$), porém a latência diminuiu em função dos dias de observação ($F_{3,99} = 28,001$; $P < 0,00001$). Nesse sentido, a latência alimentar foi menor a partir do segundo dia, se mantendo em magnitude similar ao longo dos dias, quando comparado ao primeiro dia, indicando que os animais aumentaram a motivação para se alimentar conforme o tempo decorreu após introdução nos aquários experimentais.



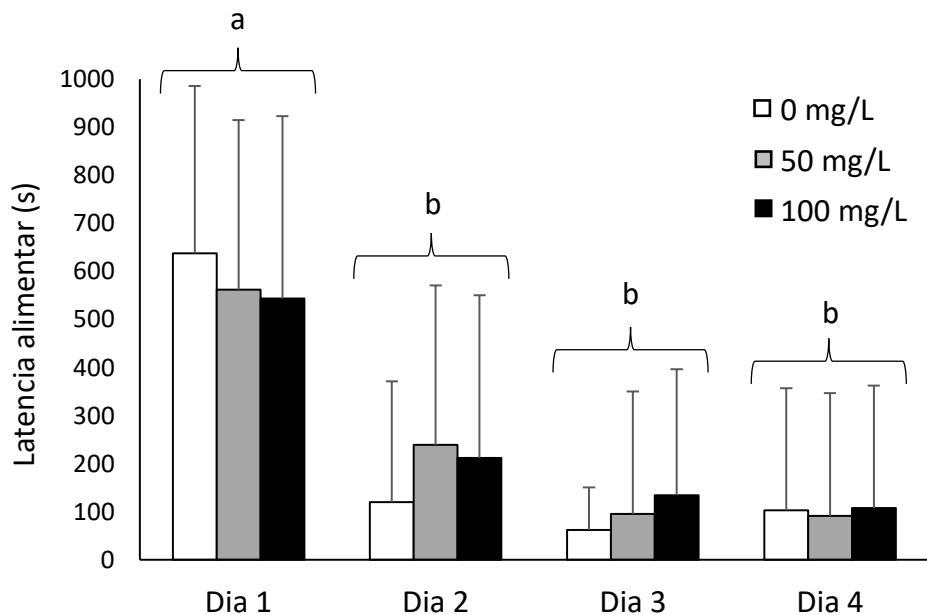


Fig. 3. Efeitos do óleo de cravo na latência alimentar na tilápia-do-Nilo. Como revelado pela ANOVA mista para latência alimentar, não houve efeito significativo do óleo de cravo ($F_{2,33} = 0,748$; $P = 0,481$), nem interação do anestésico com o tempo ($F_{6,99} = 0,433$; $P = 0,856$), mas a latência diminuiu em função do tempo ($F_{3,99} = 28,001$; $P < 0,00001$). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas na ingestão alimentar em função do tempo. Os valores são médias (\pm DP).

3.c. Comportamento agressivo

A latência para atacar o espelho foi medida em 2 momentos diferentes (no intervalo de 0 a 5 min e no de 5 a 10 min) em cada teste do espelho. Em relação ao primeiro teste do espelho (Fig. 4A), como mostrou a ANOVA mista, não houve efeitos do anestésico ($F_{2,33} = 0,037$; $P = 0,964$), tempo ($F_{1,33} = 1,076$, $P = 0,307$) ou interação entre eles ($F_{2,33} = 0,489$, $P = 0,618$). Isso indica que os peixes não diferiram em relação à reatividade à presença do espelho (primeiro intervalo), nem quanto motivação para retomar a interação com o espelho, pois não diferiram em relação à resposta de sobressalto.

No segundo teste do espelho (Fig. 4B), como revelado pela ANOVA mista, houve uma interação estatisticamente significativa entre o anestésico e o momento eles ($F_{2,33} = 3,356$, $P = 0,047$). Enquanto a latência foi igual entre os grupos, tanto no

primeiro momento (0-5 min) quanto no segundo momento (5-10 min), houve uma queda na latência do primeiro para o segundo momento nos peixes anestesiados com a dose de 50 mg/L. Entretanto o significado dessa queda é incerto, pois os valores, como dito, não foram diferentes em relação aos outros grupos (0 mg/L e 100 mg/L).

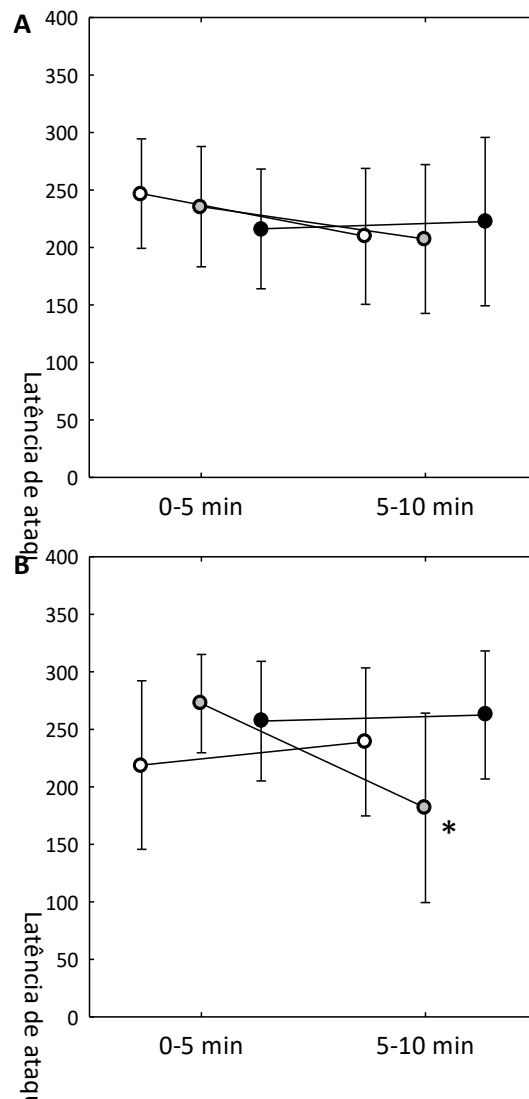


Fig. 4. Efeitos do óleo de cravo na latência de ataque na tilápia-do-Nilo. Não houve diferenças significativas no primeiro (4A) teste do espelho (ANOVA mista, efeito do anestésico, $F_{2;33} = 0,037$; $P = 0,964$; do momento $F_{1;33} = 1,076$, $P = 0,307$; ou interação entre eles, $F_{2;33} = 0,489$, $P = 0,618$). Contudo, no segundo teste do espelho (4B), observamos uma interação entre o anestésico e o momento (ANOVA mista, $F_{2;33} = 3,356$, $P = 0,047$), onde a latência de ataque foi menor no segundo momento em relação ao primeiro para os peixes anestesiados com óleo de cravo na concentração de 50 mg/L, conforme indicado pelo asterisco. Os valores são médias (\pm DP).

Em relação ao primeiro teste do espelho, a ANOVA mista aplicada não revelou diferenças significativas em relação à frequência de ataques no espelho em função do anestésico (toques, $F_{2,33} = 0,221$, $P = 0,803$, Fig. 5A; mordidas, $F_{2,33} = 0,410$, $P = 0,666$, Fig. 5B), tempo (toques, $F_{1,33} = 0,739$, $P = 0,396$, Fig. 5A; mordidas, $F_{1,33} = 0,022$, $P = 0,882$, Fig. 5B) ou interação entre esses fatores (toques, $F_{2,33} = 0,104$, $P = 0,901$, Fig. 5A; mordidas, $F_{2,33} = 0,261$, $P = 0,772$, Fig. 5B). Especificamente, o número de toques

ou de

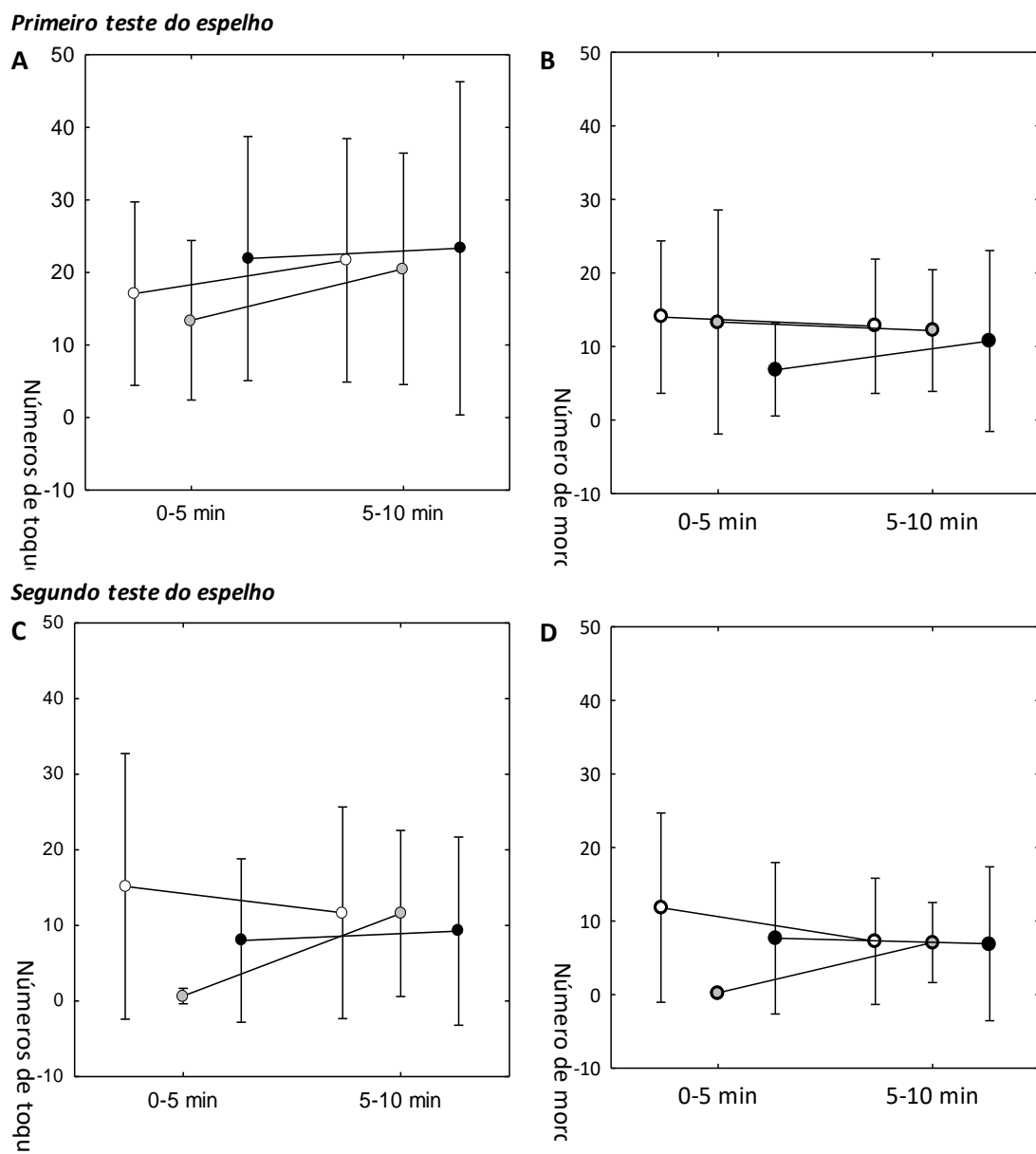


Fig. 5. Efeitos do óleo de cravo no número de ataques na tilápia-do-Nilo. Como revelado pelas ANOVAs mistas, não houve diferenças significativas nem no primeiro teste do espelho (efeitos do anestésico,

toques, $F_{2,33} = 0,221$, $P = 0,803$, 5A, mordidas, $F_{2,33} = 0,410$, $P = 0,666$, 5B; do tempo, toques, $F_{1,33} = 0,739$, $P = 0,396$, 5A, mordidas, $F_{1,33} = 0,022$, $P = 0,882$, 5B; ou interação entre esses fatores, toques, $F_{2,33} = 0,104$, $P = 0,901$, 5A; mordidas, $F_{2,33} = 0,261$, $P = 0,772$, 5B),nem no segundo (efeitos do anestésico,toques, $F_{2,33} = 0,612$, $P = 0,546$, 5C; mordidas, $F_{2,33} = 0,800$, $P = 0,458$, 5D; do tempo, toques, $F_{1,33} = 0,724$, $P = 0,401$, 5C, mordidas, $F_{1,33} = 0,033$, $P = 0,857$, 5D; ou interação entre eles, toques, $F_{2,33} = 1,560$, $P = 0,225$, 5C, mordidas, $F_{2,33} = 1,487$, $P = 0,241$, 5D) para o número de toques ou mordidas no espelho.

mordidas no espelho foram similares tanto entre os grupos dentro de um mesmo momento (0-5 min ou 5-10 min), bem como em um mesmo grupo entre os momentos.

Em relação ao segundo teste do espelho, foram observados os mesmos efeitos do anestésico (toques, $F_{2,33} = 0,612$, $P = 0,546$, Fig. 5C; mordidas, $F_{2,33} = 0,800$, $P = 0,458$, Fig. 5D) , tempo (toques, $F_{1,33} = 0,724$, $P = 0,401$, Fig. 5C; mordidas, $F_{1,33} = 0,033$, $P = 0,857$, Fig. 5D) ou interação entre eles (toques, $F_{2,33} = 1,560$, $P = 0,225$, Fig. 5C; mordidas, $F_{2,33} = 1,487$, $P = 0,241$, Fig. 5D), com o mesmo perfil de resposta descrito para o primeiro teste.

4. Discussão

Neste estudo, mostramos que o óleo de cravo não afeta a reatividade a estímulos relevantes e a motivação comportamental na tilápia-do-Nilo. Comportamentos típicos (comportamento alimentar e agressivo) foram usados como indicadores para a quantificação dos efeitos desse anestésico em componentes consumatórios e apetitivos do comportamento. Assim, a ausência de alterações significativas nas atividades alimentares e agressivas induzidas pelo óleo de cravo sustenta nossa conclusão teórica. Operacionalmente, o número de dias que as tilápias se alimentaram, a quantidade de alimento ingerida e a latência para abocanhar o alimento não foram afetadas pelo óleo de cravo. Nessa linha, as variáveis operacionais relativas ao comportamento agressivo (latência de ataque e número de ataques ao espelho) também não foram afetadas pelo anestésico. Em uma perspectiva associada à aquicultura, esses achados são positivos, pois acrescentam informações que indicam que o uso do óleo essencial de cravo é seguro para uso em tilápias-do-Nilo quanto a interferências em comportamentos essenciais.

O óleo de cravo foi efetivo em induzir sedação na tilápia-do-Nilo, e o efeito foi dose dependente. Observamos menor tempo para se atingir sedação na maior concentração de anestésico (100 mg/L) em comparação à menor concentração (50 mg/L) utilizada, corroborando achados prévios para esta espécie (Vidal et al., 2008; Simões et al., 2011; Medeiros-Silva et al., 2014). Como o grupo controle (0 mg/L) não foi obviamente sedado, temos claramente 3 condições experimentais distintas: peixes não sedados (0 mg/L - controle) e peixes sedados em 2 níveis distintos (50 e 100 mg/L). De tal modo, qualquer diferença comportamental potencialmente existente, é plausível assumir como efeito dessas diferenças experimentais impostas, visto que os demais procedimentos metodológicos foram iguais. Contudo, nenhuma diferença relevante no

comportamento alimentar e agressivo foi observada em função do anestésico. Assim, nossas condições metodológicas permitem a inferência de que o óleo de cravo não afeta a reatividade a estímulos relevantes e a motivação comportamental na tilápia-do-Nilo.

Metodologicamente, a operacionalização das nossas variáveis comportamentais permite a inferência sobre a reatividade a estímulos relevantes e a motivação para se engajar em tais atividade. A execução de uma ação comportamental pode resultar da ocorrência de um estímulo (componente/consumatório) e a resposta pode ter intensidades diferentes, algo que está associado com a motivação interna (componente apetitivo) para executar dada ação (Koob et al., 2013). Contudo, pela dificuldade de definir as divisões entre tais componentes, mas recentemente tais componentes vêm sendo considerado um continuum, ao invés de uma dicotomia (Sachs, 2007 e 2008). No caso do presente estudo, embora não seja possível determinar as fronteiras entre tais componentes, temos claramente a avaliação da reatividade a um estímulo pertinente, como a presença de alimento ou da simulação da presença de um intruso de território pelo uso de espelhos. Além disso, avaliamos as variáveis operacionais que compunham os comportamentos alimentar (Volpato et al., 2013) e agressivo (Arnott e Elwood, 2009) de modo a elucidar a intensidade da resposta e o quanto os indivíduos estavam determinados em se manterem em tais atividades.

Na literatura, a concentração de óleo de cravo usado para anestesia por exposição em banho varia, mas sendo comum um intervalo entre 50 e 150 mg/L (Vidal et al., 2008; Simões et al., 2011; Diemer et al., 2012; Medeiros-Silva et al., 2014). As concentrações utilizadas aqui, de 50 e 100 mg/L, está nessa faixa típica e induziu eficientemente anestesia nos animais em cerca de 65 s e 128 s, respectivamente, em média. Nenhuma alteração comportamental relevante foi observada frente a essas

concentrações típicas e tempo de exposição ao óleo de cravo (para atingir o estágio II de anestesia, como descrito em (Gilderhus e Marking, 1987 e Stoskopf, 1993).

O óleo de cravo tem sido usado eficientemente como anestésico para a tilápia (Vidal et al., 2008; Simões et al., 2011; Medeiros-Silva et al., 2014) e outras espécies de peixes (Keene et al., 1998; Cho e Heath, 2000; Tort et al., 2002; Cooke et al., 2004; Hoskonen e Pirhonen, 2004; Rotili et al., 2012; Diemer et al., 2012). Contudo, avaliações de alterações comportamentais induzidas pelo óleo de cravo têm sido descrições que indicam que o animal alcançou determinado estágio, relativo à sedação (Cooke et al., 2004; Simões et al., 2010), mas não em relação a sua consequência comportamental posterior, exceto pela documentação de potencial efeito protetor ao estresse em situações estressantes, como o transporte de peixes (Cooke et al., 2004; Inoue et al., 2005; Simões et al., 2011). Até onde nós sabemos, esse é o primeiro estudo que mostra que o óleo de cravo não altera componentes consumatórios e apetitivos de comportamentos relevantes na tilápia-do-Nilo.

O uso de anestésicos em peixes contribui para a melhoria do bem-estar em práticas experimentais e manejos inerentes à piscicultura porque evita sofrimento desnecessário. De fato, existe um consenso de que os peixes apresentam respostas neuroendócrina-comportamentais de estresse a estímulos nocivos (Barton, 2002), como aqueles que causam dor ou desconforto (Rose, 2002). Assim evitar respostas potencialmente prejudiciais consiste em importante meta ao se considerar questões sobre o bem-estar em peixes (Rose, 2002). No entanto, o próprio anestésico, embora evite sofrimento imediato, poderia induzir alterações biológicas relevantes. Contudo, baseado em nossas evidências, podemos considerar o uso do óleo de cravo seguro em termos de alterações comportamentais imediatas quando considerado os comportamentos alimentar e agressivo na tilápia-do-Nilo. Outros comportamentos

podem ser alvos de testes em estudo futuros, além de estudos farmacológicos para se testar potenciais alterações orgânicas relevantes, como dano de DNA ou estresse oxidativo.

Referências bibliográficas

- Anderson, W.G., Mckinley, R.S., et al., 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*. 17, 301-307.
- Arnott, G., Elwood, R., 2009. Probing aggressive motivation in a cichlid fish. *Biology Letters*, 5(6), 762–764.
- Barbosa, J.A., Magalhes, E.J., et al., 2010. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Ethologica*. 13 (2), 119-126.
- Barreto, B.E., Luchiari, A.C., et al., 2003. Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behaviour Processes*. 60, 235-239.
- Barreto, B.E., Barbosa, A., et al., 2010. The 'club' cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. *Marine and Freshwater Behaviour Physiology*. 43, 75-81.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 42, 517– 525.
- Blanchard, R.J., Fannelly, K.J., et al., 1986. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal Comparative Psychology*. 10 (2), 101–107.
- Bowker, J.D., Trushenski, J.T., et al., 2015. Sedative options for fish research: a brief review with new data on sedation of warm-, cool-, and coldwater fishes and recommendations for the drug approval process. *Review in Fish Biology and Fisheries* 25, 147–163.
- Chandroo, K.P., Dubnican, I.J.H., et al., 2004. Can fish suffer: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*. 86 (3), 225–250.
- Cho, G.K., Heath, D., 2000. Comparison of tricaine methane sulphonate (MS222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Walbaum). *Aquaculture Research*, 31, 537 – 546.

- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behavior Science*. 86, 205–223.
- Cooke, S., Suski, C.D., et al., 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture* 239, 509–529.
- Diemer, O., Dacle, H.N., 2012. Eugenol anesthetic for silver catfish (*Rhamdia voulezi*) with different weight. 33 (4), 1495 – 1500.
- Endo, T., Ogishima, K., 1972. Studies of the anesthetic effect of eugenol in some freshwater fishes. 38, 761–767.
- Franchina, C.R., Stoddard, P.K., 1998. Plasticity of the electric organ discharge wave form of the electric fish (*Brachyhypopomus pinnicaudatus*) - I. Quantification of day night changes. *Journal Comparative Physiology A*. 183, 759-768.
- Giaquinto, P.C., Volpato, G.L., 2001. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behaviour*. 138, 1205 – 1214.
- Gilderhus, P.A., Marking, L.L., 1987. Comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries and Management*. 7,288-292.
- Gontijo, A.M.M.C., Barreto, R.E., et al., 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research*. 534, 165-172.
- Gonyou, H.W., 1994. Why the study of animal behavior is associated with the animal-welfare issue. *Journal Animal Science*. 72, 2171–2177.
- Griffiths, S.P., 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rock pool fishes. *Journal of Fish Biology*. 57, 1453 –1464.
- Guénette, S.A., Vachon, P., et al., 2007. Pharmacokinetic of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 226, 262-265.
- Hoskonen, P., Pirhonen, J., 2004. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. *Journal of Fish Biology*, 64 (4), 1136-1142.

- Huntingford, F.A., Adams, C.E., et al., 2006. Current Issues in Fish Welfare. *Journal of Fish Biology*. 68 (2), 332–372.
- Ide, L.M., Urbinati, E.C., et al 2003. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in (*Brycon cephalus*). *Journal Fish Biology*. 63, 332-343.
- Inoue, L., Antônio, K. A., et al., 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Bryconcephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*. 35(2), 289-295.
- Javahery, S., Nekoubin, H., et al., 2012. Effect of anaesthesia with clove oil in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 38(6), 1545–1552.
- Medeiros-Silva, R.M., Lima, E.L.R., et al., 2014. Engenol na anestesia da Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Agrarian*. 7 (26), 590-597.
- Kats, L.B., Dill, L.M., 1998. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*. 5, 361–394.
- Ke, C., Liu, Q., et al., 2018. Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets. *Aquaculture*. 484, 338-342.
- Keene, J.I., Noakes D.I.G., et al., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). *Aquaculture Research*. 29, 89–101.
- Koob, B.J., Everitt, T.W., et al., 2013. Chapter 41 - Reward, Motivation, and Addiction, Editor(s): Larry R. Squire, Darwin Berg, Floyd E. Bloom, Sasha du Lac, Anirvan Ghosh, Nicholas C. Spitzer, *Fundamental Neuroscience (Fourth Edition)*, Academic Press. 871–898.
- Munday, P.L., Wilson, S.K., 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of (*Pomacentrus amboinensis*), a coral reef fish. *Journal Fish Biology*. 51, 931-938.
- Rose, J.D., 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain, *Reviews in Fisheries Science*. 10, 1–38.

- Ross, L.G., Ross, B., 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals
Oxford: Blackwell Science, 3, 159p.
- Rotili, D.A., Devens, M.A., et al., 2012. Uso de eugenol como anestésico em pacu.
Pesquisa Agropecuária Tropical. 42 (3), 288-294.
- Sachs, B.D., 2007. A contextual definition of male sexual arousal. *Hormones
Behavior*.51 (5), 569–578.
- Sedgwick, C.J., 1986. Anesthesia in fish. *Veterinary Clinics of North America. Veterinary
Clinics of North America. Food and Animal Practice*. 23, 737–742.
- Simões, L.N., Paiva, G., et al., 2010. Óleo de cravo como anestésico em adultos de
tilápia-do-nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45(12), 1472–1477.
- Simões, L.N., Lombardi, et al., 2011. Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and
transportation of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) (*Actinopterygii:
Cichlidae*) juveniles. *Zoologia (Curitiba)*. 28(3), 2852–90.
- Sladry, K.K., SWANSON, C.R., et al. 2001. Comparative efficacy of tricaine
methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus
brachypomus*). *American Journal Veterinary Research*.3, 337-342.
- Soto, C., Burhanuddin., 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and
weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*. 136, 149-152.
- Stoskopf, M., Anaesthesia., 1993. *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and
medicine*. London: Pergamon Veterinary Handbook Series. 161-168.
- Summerfelt, R.C., Smith, L.S., 1990. Methods for fish biology. In: Schreck CB, Moyle
PB (Eds) *Anaesthesia, surgery and related techniques*. American Fisheries
Society, Bethesda. 213–272.
- Tort, L., Puigcerver, M., et al., 2002. Cortisol and haematological response in sea bream
and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2- phenoxyethanol.
Aquaculture Research. 33 (11), 970 – 910.
- Vidal, L.V.O., Albinati, R.C.B., et al. 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-
nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(8), 1069-1074.

- Volpato, G.L., Freitas, E.G., et al., 2007. Insights into concept of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms*. 75 (2), 165-171.
- Volpato, G.L., 2009., Challenges in Assessing Fish Welfare. *ILAN journal*. 50 (4). 329-337
- Volpato, G.L., Bovi, T.S., et al., 2013. Red Light Stimulates Feeding Motivation in Fish but Does Not Improve Growth. *PLOS ONE*. 8(3), 59–134.
- Woody, C.A., Nelson, J., et al., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon Field trials. *Journal of Fish Biology*. 60, 340–347.